

Direction des bibliothèques

AVIS

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal

Caractérisation de l'effet des adjuvants CpG et toxine choléra sur la réponse immunitaire
générée par le fimbriae F4 administré oralement chez le porc

par

Benjamin Delisle

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales
en vue de l'obtention du grade
Maître ès sciences (M. Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Juillet 2008

© Benjamin Delisle, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé

Caractérisation de l'effet des adjuvants CpG et toxine choléra sur la réponse immunitaire
générée par le fimbriae F4 administré oralement chez le porc

présenté par
Benjamin Delisle

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Sylvain Quessy, président-rapporteur
John M. Fairbrother, directeur de recherche
Éric Nadeau, codirecteur
Mariela A. Segura, membre du jury

Résumé

La vaccination orale est une solution prometteuse pour la prévention d'infections entériques dont les *Escherichia coli* entérotoxigènes F4 positif, principale cause de diarrhée post-sevrage chez le porc. Le développement d'un vaccin sous-unitaire constitué de fimbriae F4 et d'un adjuvant mucosal est souhaitable pour la prévention de cette maladie dans des situations où l'utilisation de vaccins vivants est inappropriée. Des essais d'immunisation ont été accomplis chez le porc pour évaluer l'efficacité de l'administration orale de fimbriae F4 avec le CpG-A D19 ou avec la toxine choléra complète, incorporé dans une formule d'amidon et d'amylose hautement carboxyméthylée pour stimuler une réponse humorale F4 spécifique. La réponse humorale et la variation de l'expression de certaines cytokines ont été déterminées par ELISA et RT-PCR semi-quantitatif, respectivement. Les résultats ont démontré que le CpG augmentait significativement la réponse spécifique à F4 en stimulant la production d'IgM et d'IgG dans les sécrétions intestinales et par l'augmentation de cytokines de type Th1 (IFN- γ , IL-12p40, TNF- α and IL-1 β) et Th2 (IL-4 and IL-6) dans les tissus intestinaux. Cependant, l'ajout de la toxine choléra n'a pas induit d'anticorps spécifiques à F4 dans les sécrétions intestinales, quoiqu'une réponse de type Th1 (IFN- γ , IL-18 and IFN- α) a été détectée dans les tissus intestinaux. Aucun anticorps systémique ou IgA intestinal spécifique à F4 n'a été détecté au cours de l'essai d'immunisation pour tous les groupes. En conclusion, l'immunisation orale avec l'adjuvant CpG-A D19 a amélioré la réponse humorale intestinale contre le fimbriae F4 et a démontré un patron cytokinaire de type Th1 et Th2, faisant du CpG D19 un adjuvant prometteur pour le développement d'un vaccin F4 sous-unitaire oral chez le porc.

Mots-clés : fimbriae F4, CpG, Réponse immunitaire, *Escherichia coli* entérotoxigène (ETEC), Porc

Abstract

Oral vaccination is a promising strategy to prevent the development of enteric infections. In swine, F4-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* is the major bacterial cause of post-weaning diarrhea. The development of a subunit vaccine containing F4 fimbriae and a mucosal adjuvant is desirable for situations where existing live vaccines are not appropriate. Immunisation trials in swine were done to evaluate the efficacy of oral administration of F4 fimbriae supplemented with CpG-A D19 or complete cholera toxin, formulated with a carboxymethyl high amylose starch excipient, to stimulate F4-specific humoral response. The humoral and cytokine responses in tissues were determined by ELISA and semi-quantitative RT-PCR, respectively. The results showed that CpG significantly augmented F4-specific response by enhancing IgM and IgG levels in intestinal secretions, and by increasing Th1 (IFN- γ , IL-12p40, TNF- α and IL-1 β) and Th2 (IL-4 and IL-6) cytokine production in intestinal tissues. On the other hand, the supplementation with cholera toxin did not induce any F4-specific antibodies in secretions, although a significant Th1 (IFN- γ , IL-18 and IFN- α) response was detected in tissues. No F4-specific systemic antibodies or intestinal secreted IgA were detected throughout the immunisation trial for all groups. In conclusion, oral immunisation with CpG-A D19 adjuvant enhanced intestinal humoral response against F4 fimbriae and demonstrated a Th1 and Th2 cytokine pattern, indicating that CpG D19 is a promising adjuvant for the development of an oral F4 subunit vaccine.

Keywords : F4 fimbriae, CpG, Immune response, *Escherichia coli* enterotoxigenic (ETEC), Pig

Table des matières

| | |
|---|-------------|
| Résumé | iii |
| Abstract | iv |
| Table des matières | v |
| Liste des tableaux | viii |
| Liste des figures | ix |
| Liste des sigles et abréviations | xi |
| Remerciements | xiii |
| Introduction | 1 |
| Recension de la littérature | 2 |
| 1. Escherichia coli | 3 |
| 1.1. Caractéristiques générales | 3 |
| 1.2. Classification | 4 |
| 1.2.1. Sérotypage; O, K, H | 4 |
| 1.2.2. Pathotype | 4 |
| 1.2.3. Virotipe; Facteurs de virulence | 5 |
| 2. Diarrhée Post-Sevrage (DPS) | 6 |
| 2.1. Généralités | 6 |
| 2.2. Agents causaux et pathogenèse | 7 |
| 2.3. ETEC F4-positif (F4+) | 8 |
| 2.3.1. Fimbriae F4 | 8 |
| 2.4. Récepteurs du fimbriae F4 | 10 |
| 2.5. Pathogenèse ETEC F4+ | 11 |
| 2.6. Prévention et contrôle | 12 |
| 3. Système immunitaire mucosal (SIM) | 13 |
| 3.1. Description du SIM | 13 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 3.2. | Induction de la réponse immunitaire | 15 |
| 3.2.1. | Cytokines | 18 |
| 3.3. | Développement du système immunitaire porcin | 20 |
| 3.3.1. | Immunité passive | 21 |
| 3.3.2. | Impact du sevrage sur le développement du SIM porcin | 22 |
| 4. | Réponse immunitaire spécifique aux fimbriae F4 | 22 |
| 4.1. | Réponse immunitaire aux vaccins F4 parentéraux | 22 |
| 4.2. | Réponse immunitaire aux vaccins F4 oraux | 23 |
| 4.2.1. | Procédures d'administration des fimbriae F4 | 23 |
| 4.2.2. | Réponse humorale aux fimbriae F4 | 26 |
| 4.2.3. | Cinétique de la réponse anti-F4 | 26 |
| 4.2.4. | Réponse cytokinaire aux fimbriae F4 | 27 |
| 5. | Vaccins | 27 |
| 5.1. | Généralités | 27 |
| 5.2. | Vaccins mucosaux | 28 |
| 5.2.1. | Vaccins oraux sous-unitaire | 28 |
| 5.2.2. | Système de livraison macroscopique | 29 |
| 5.3. | Adjuvants | 30 |
| 5.3.1. | Adjuvants immuno-stimulateur | 31 |
| 5.3.1.1. | Toxine choléra | 31 |
| 5.3.1.2. | CpG | 33 |
| 5.3.1.2.1. | Effet des CpG sur le système immunitaire | 34 |
| 5.3.1.2.2. | Type de CpG | 35 |
| 5.3.1.2.3. | CpG spécifique à l'espèce porcine | 36 |
| | Méthodologie et résultats | 39 |
| | Article: Oral immunisation with F4 fimbriae and CpG enhances F4-specific mucosal immune response and induces Th1 and Th2 cytokine modulation in swine | 40 |
| | Abstract | 41 |
| | 1. Introduction | 42 |
| | 2. Materials and methods | 45 |

| | |
|------------------------|-------------|
| 3. Results | 53 |
| 4. Discussion | 55 |
| Acknowledgments | 64 |
| References | 64 |
| Discussion | 72 |
| Conclusion | 83 |
| Bibliographie | 85 |
| Annexe 1 | xiv |
| Annexe 2 | xvii |

Liste des tableaux

| | |
|--|---|
| Tableau I) Exemples de différents facteurs de virulence impliqués dans différentes maladies entériques causées par les <i>E. coli</i> | 6 |
|--|---|

| | |
|---|----|
| Tableau II) Résumé des différents résultats obtenus lors de l'immunisation avec le fimbriae F4 par voie orale chez le porc | 25 |
|---|----|

Article: Oral immunisation with F4 fimbriae and CpG enhances F4-specific mucosal response and induces Th1 and Th2 cytokine modulation in swine

| | |
|--|----|
| Table 1. Summary of cytokine mRNA expression in different intestinal tissues for the F4-CpG and F4-CT groups..... | 69 |
|--|----|

Annexe 2

| | |
|---|-------|
| Tableau II) Résumé des différentes expériences réalisées pour vérifier l'intégrité des fimbriae F4 après l'irradiation | xviii |
|---|-------|

Liste des figures

| | |
|---|-----|
| Figure 1. Étapes impliquées dans la pathogénèse des différents pathotypes d' <i>Escherichia coli</i> chez les animaux..... | 5 |
| Figure 2. Assemblage des protéines dans la biosynthèse du fimbriae F4..... | 9 |
| Figure 3. Structure des plaques de Peyer. Détails de la structure des cellules M (coté gauche) et résumé des événements après l'administration orale d'un antigène (coté droit)..... | 14 |
| Figure 4. Échantillonnage antigénique et interactions cellulaires subséquentes dans la paroi intestinale..... | 16 |
| Figure 5. Paradigme Th1/Th2 et les cytokines impliquées..... | 19 |
| Figure 6. Mécanisme d'action des CpG sur la réponse immunitaire innée et acquise | 36 |
| Article: Oral immunisation with F4 fimbriae and CpG enhances F4-specific mucosal response and induces Th1 and Th2 cytokine modulation in swine | |
| Figure 1. Effect of oral immunisation with F4 fimbriae or F4 supplemented with adjuvants CpG or CT and unvaccinated groups on mean F4-specific IgM serum antibody titers at different times after initial immunisation..... | 70 |
| Figure 2. Effect of oral immunisation with F4 fimbriae or F4 supplemented with adjuvants CpG or CT and unvaccinated groups on mean F4-specific IgM antibody titers in the small intestinal contents of pigs at 26 days after initial immunisation..... | 71 |
| <u>Annexe 1</u> | |
| Figure 7. Titres sériques moyens d'anticorps IgM anti-F4 des groupes F4, F4-CpG, et non vaccinés de la première expérience <i>in vivo</i> | xv |
| Figure 8. Titres sériques moyens d'anticorps IgA anti-F4 des groupes F4, F4-CpG, et non vaccinés de la première expérience <i>in vivo</i> | xv |
| Figure 9. Titres sériques moyens d'anticorps IgM anti-F4 des groupes F4, F4-CT, F4-CpG, et non vaccinés de la deuxième expérience <i>in vivo</i> | xvi |
| Figure 10. Titres moyens d'anticorps IgM anti-F4 des contenus intestinaux des groupes F4, F4-CT, F4-CpG, et non vaccinés de la deuxième expérience <i>in vivo</i> | xvi |

Annexe 2

Figure 11. Test d'adhésion par immunofluorescence anti-F4 – Avant irradiation.....xix

Figure 12. Test d'adhésion par immunofluorescence anti-F4 – Après irradiation.....xix

Figure 13. Détection du fimbriae F4 par western sur préparation de F4 après irradiation....xix

Figure 14. SDS-Page sur préparation de fimbriae F4 avant irradiation.....xx

Figure 15. SDS-Page sur préparation de fimbriae F4 après irradiation.....xx

Liste des sigles et abréviations

| | |
|-----------------|---|
| Ac | Anticorps |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| Ag | Antigène |
| ARNm | Acide ribonucléique messager |
| BALT | Bronchus-associated lymphoid tissue (Tissus lymphoïde associé aux bronches) |
| BSA | Bovine serum albumin (Albumine du sérum bovin) |
| CCPA | Conseil Canadien de Protection des Animaux |
| CMH-II | Complexe majeur d'histocompatibilité de classe 2 |
| CM-HAS | Carboxy Methyl - High Amylose Starch |
| CpG-ODN | Cytosine-phosphate-Guanosine oligodeoxynucleotide |
| CT | cholera toxin (toxine choléra) |
| DPS | Diarrhée post-sevrage |
| East1 | Enteraggregative <i>Escherichia coli</i> heat stable toxin 1 (Toxine 1 résistante à la chaleur d' <i>Escherichia coli</i> entéroaggrégatif) |
| EPEC | Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> Entéropathogène) |
| ETEC | Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> entérotoxigène) |
| ExPEC | Extra-intestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> pathogène extra-intestinal) |
| FAE | Follicle associated epithelium (lymphoépithélium) |
| F4R | Récepteur spécifique de F4 |
| GALT | Gut-associated lymphoid tissue (Tissue lymphoïde associé à l'intestin) |
| Gm ₁ | Monosialogangliosides |
| HSA | Human serum albumin (Albumine du sérum humain) |
| Ig | Immunoglobuline |
| IL-13 | Interleukine 13 |
| IL-12 | Interleukine 12 |
| IL-10 | Interleukine 10 |
| IL-8 | Interleukine 8 |
| IL-6 | Interleukine 6 |
| IL-5 | Interleukine 5 |
| IL-4 | Interleukine 4 |
| IL-2 | Interleukine 2 |
| IL-1 | Interleukine 1 |
| INF- α | Interféron alpha |
| INF- γ | Interféron gamma |
| Jrs | Jours |
| KLH | Keyhole Limpet Hemocyanin |
| LP | Lamina propria |
| LPS | Lipopolysaccharide |

| | |
|--------------|--|
| LT | Heat-Labile toxin (Toxine thermolabile) |
| MALT | Mucosa-associated lymphoid tissue (Tissu lymphoïde associé à la muqueuse) |
| Mg | Milligramme |
| NK | Natural Killer cell (cellule tueuse naturelle) |
| PBMN | Peripheral Blood Mononuclear cells (cellules mononucléaires circulant dans le sang) |
| PCR-RFLP | Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (Réaction en chaîne par polymérase - polymorphisme par restriction de longueur de fragment) |
| PO | Phosphodiester |
| PTO | Phosphorothioate |
| pIgR | Polymeric Immunoglobulin receptor (Récepteur d'immunoglobuline polymérique) |
| PP | Plaque de Peyer |
| PRR | Pattern recognition receptor (Récepteur de reconnaissance de motifs) |
| SIM | Système immunitaire muçosale |
| STa | Heat Stable toxin « a » (toxine thermostable « a ») |
| STb | Heat Stable toxin « b » (toxine thermostable « b ») |
| STEC | Shigatoxin producing <i>Escherichia coli</i> (<i>Escherichia coli</i> producteur de Shigatoxine) |
| SIMC | Système immunitaire mucosal commun |
| SPF | Specified pathogen free (Libre de pathogène spécifique) |
| TGF- β | Transforming growth factor-beta (Facteur transformant de croissance-béta) |
| TGI | Tractus gastro-intestinal |
| Th | T- helper cell (Cellule T auxilliaire) |
| TLR9 | Toll-like receptor 9 (Récepteur « Toll-like » 9) |
| TNF-a | Tumor necrosis Factor alpha (Facteur nécrosant des tumeurs-alpha) |
| UALT | Urogenital-associated lymphoid tissue (Tissu lymphoïde associé à la muqueuse urogénitale) |

Remerciements

J'aimerais remercier le Dr John Fairbrother pour m'avoir donné l'opportunité d'accomplir une maîtrise dans le laboratoire d'*Escherichia coli* (Ecl). Ainsi que pour son appui financier et ses conseils judicieux tout au long du parcours de ma maîtrise. Je remercie aussi mon co-directeur Éric Nadeau pour son appui et ses conseils.

Je remercie aussi mon comité conseil: John Fairbrother, Éric Nadeau, Martin Lessard et Marcelo Gotschalk pour leur aide. J'inclus aussi dans ces remerciements les techniciennes du laboratoire Ecl, particulièrement pour leur travail lors des essais *in vivo*.

Ensuite, j'aimerais remercier les gens du GREMIP et du CRIP pour une bourse reçu au 1^{er} symposium du CRIP, ainsi que la compagnie Pfizer pour l'obtention d'une bourse.

Finalement, j'aimerais remercier toute ma famille, plus spécifiquement, Joaquim et Stéphanie pour m'avoir inspiré et supporté au cours de mes études de maîtrise.

Introduction

Les *Escherichia coli* (*E. coli*) font partie de la flore commensale intestinale du porcelet mais sont aussi responsables d'une grande partie des infections intestinales d'origine bactérienne, plus particulièrement en période post-sevrage. Parmi les types de *E. coli* impliqués dans les infections fréquentes de diarrhée post-sevrage (DPS), on retrouve les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) possédant les fimbriae F4 (aussi nommé K88). Les répercussions de la DPS se traduisent généralement par de la diarrhée qui engendre des pertes de gain de poids, ainsi que des coûts liés au traitement. La vaccination orale à l'aide de sous-unités bactériennes, plus spécifiquement du fimbriae F4, est une méthode prometteuse pour prévenir cette maladie.

Plusieurs études ont démontré l'efficacité du fimbriae F4 comme agent immunogène lorsqu'il est administré oralement. Par contre, les résultats obtenus étaient mitigés quant à la capacité de ce type de vaccin sous-unitaire à réduire ou prévenir la DPS. De plus, de grandes quantités de fimbriae F4 étaient nécessaires pour stimuler le système immunitaire, principalement à cause de la susceptibilité du fimbriae F4 à la dégradation lors du transit gastrique en milieu acide. Cependant, ces inconvénients peuvent être contournés par l'ajout d'adjuvant et l'utilisation d'un système de livraison.

Le but du projet était de développer un vaccin oral sous-unitaire consistant en de faibles doses de fimbriae F4 additionnés d'adjuvant et enrobés d'un système de livraison pour stimuler le système immunitaire humoral. Pour se faire, deux adjuvants mucosaux ont été évalués, soit le CPG-A D19 et la toxine choléra (CT). De plus, le projet consistait aussi à évaluer l'effet des formulations vaccinales sur la réponse cytokinaire de l'hôte de manière à caractériser les mécanismes immunitaires sous-jacents.

Recension de la littérature

1. *Escherichia coli*

1.1. Caractéristiques générales

E. coli est un bâtonnet gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*. Elle est la bactérie anaérobie facultative prédominante du tractus gastro-intestinal (TGI) chez le porc, faisant partie de sa flore commensale. Les *E. coli* colonisent rapidement l'intestin des nouveaux-nés et y demeurent jusqu'à la fin de la vie de l'animal. La concentration de *E. coli* dans le TGI est à son minimum dans le début du petit intestin et augmente progressivement pour atteindre son maximum dans le gros intestin (Gyles et Fairbrother, 2004). Cependant, certaines populations d'*E. coli* sont des pathogènes pouvant causer des maladies intestinales et extra intestinales.

E. coli est généralement isolé facilement à partir d'échantillons cliniques sur des médias standards ou sélectifs avec des conditions aérobiques. Dans les fèces, la gélose MacConkey est utilisée; elle permet la croissance sélective des bactéries gram-négatives, dont les *Enterobacteriaceae*, et une différenciation des organismes entériques sur la base de leur capacité à fermenter le lactose, les *E. coli* étant lactose-positives. Par la suite, les *Enterobacteriaceae* peuvent être identifiés par l'utilisation de réactions biochimiques réalisées dans des tubes de cultures ou à l'aide de bandelettes (strips) commerciales. Le test des indoles est utilisé pour différencier *E. coli* (indole-positif) des autres *Enterobacteriaceae* (Nataro et Kaper, 1998). Il est important de spécifier que d'autres espèces bactériennes gram négatives sont lactose-positives et indole-positives. De plus, certaines souches d'*E. coli* sont lactose-négatives ou indole-négatives.

1.2. Classification

La classification des *E. coli* pathogènes a beaucoup évoluée avec le temps et la multitude de méthodes employées afin de caractériser le pouvoir pathogène des souches démontre bien cette évolution de la classification. Elle se fait selon différentes méthodes comme la culture de bactéries sur gélose, le typage des antigènes de surface (sérotypes), le mécanisme d'action de pathogénicité (pathotypes ou classes d'*E. coli*), et la présence de facteurs de virulences (virotypes ou profil de facteurs de virulence).

1.2.1. Sérotypage; O, K, H

Historiquement, le sérotypage est la base de la différenciation des sous espèces (pathogéniques) des *E. coli*. Elle était la méthode la plus utilisée avant l'identification de facteurs de virulence spécifiques et le développement de la biologie moléculaire. Selon le schéma modifié de Kauffman, le sérotypage est basé sur le profil des antigènes de surface de la bactérie : O (somatique; polysaccharides du LPS), K (polysaccharide de la capsule), H (flagelle) (Orskov et Orskov 1992, Nataro et Kaper 1998). Présentement, le sérotypage de routine inclut seulement les antigènes O et H, dont les nombres caractérisés à ce jour sont respectivement d'environ 185 et 56 (Blanco *et al.*, 2005). Par exemple, le sérotype O149:H10 est fortement associé à la DPS chez le porc. L'antigène F, pour fimbriae, est souvent inclus dans la formule sérologique, spécialement chez les souches ETEC, où le fimbriae est un facteur de virulence important permettant l'attachement de la bactérie à la paroi intestinale de l'hôte.

1.2.2. Pathotype

Les souches d'*E. coli* pathogéniques peuvent être classifiées selon les mécanismes d'action de leurs facteurs de virulence ou les symptômes cliniques observés chez l'hôte; soient les pathotypes ou classes (Levine, 1987, Nataro et Kaper 1998). Il existe différentes étapes

dans la pathogénèse des *E. coli* et elles peuvent être associées à différents pathotypes, tels que décrit dans la figure 1 : ETEC, STEC (shigatoxinogène; aussi nommé VTEC pour vétoxino-gène), EPEC (entéropathogène), ExPEC (pathogène extra intestinal), etc.

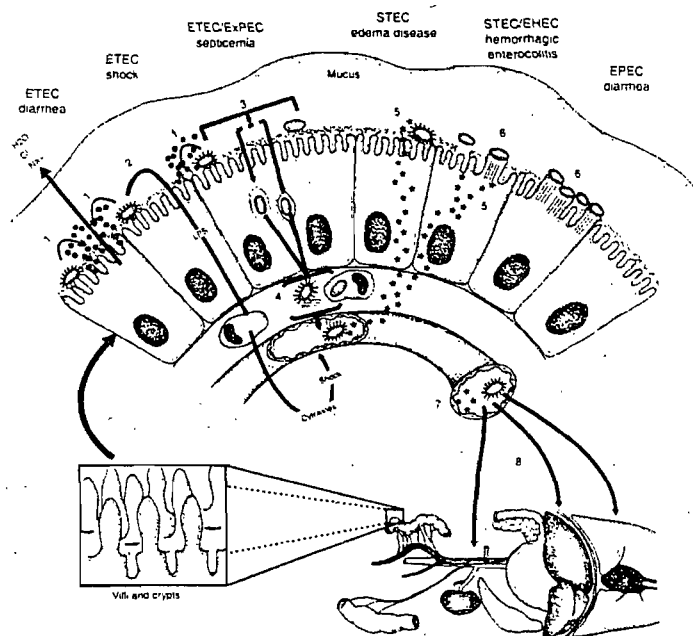


Fig. 1. Étapes impliquées dans la pathogénèse des différents pathotypes d'*Escherichia coli* chez les animaux. Tiré de Gyles et Fairbrother, (2004)

1.2.3. Virotypes; Facteurs de virulence

Le virotype fait référence aux facteurs de virulence qui sont présents chez une souche particulière d'*E. coli* de manière à caractériser son pouvoir pathogène. Les gènes de virulence peuvent être situés sur des plasmides, des bactériophages ou des îlots de pathogénicité. Ils incluent par exemple les entérotoxines, les fimbriae, les shiga-toxines et les gènes associés aux lésions de type attachant effaçant (Tableau 1) (Gyles et Fairbrother, 2004).

Tableau 1. Exemples de différents facteurs de virulence impliqués dans différentes maladies entériques causées par les *E. coli*. Tiré de (Gyles et Fairbrother, 2004).

| | |
|--------------------|-----------------|
| Entérotoxines | Sta, Stb, LT |
| Fimbriae | F4, F5, F6, F18 |
| Shiga toxines | Stx1, Stx2 |
| Attachant-effaçant | Eae, Tir, EspA |

Le virotypage est l'une des classifications les plus importantes aujourd'hui. Par exemple, les virotypes LT:STa:STb:EAST1:Paa:F4 et LT:STa:STb:F18 sont identifiés chez les ETEC responsables de la diarrhée post-sevrage chez le porc.

2. Diarrhée Post-Sevrage (DPS)

2.1. Généralités

La DPS chez le porc, aussi connue sous le nom de colibacillose entérique post-sevrage, est une des maladies causées par une infection avec un *E. coli* pathogène, résultant principalement en perte de gain de poids pouvant aller jusqu'à de la mortalité (Fairbrother *et al.*, 2005). Le taux de mortalité peut atteindre plus de 25% lors d'épisodes infectieux sévères. Cette maladie est observée à travers le monde chez les porcelets sevrés. La diarrhée engendre des pertes de gain de poids et des coûts associés à la médication et la main d'oeuvre, donc des pertes économiques pour le producteur. Elle se produit généralement dans les 2 premières semaines post-sevrage et prédispose les animaux à la maladie par la séparation de la truie, la perte des anticorps (Ac) lactifères provenant de la mère, le changement de diète (liquide vers solide) causant des changements de la flore intestinale, et des maladies concomitantes pouvant affecter négativement les fonctions immunitaires et la flore intestinale du porcelet (Fairbrother *et al.*, 2005, Melin *et al.*, 2004, Madec *et al.*, 2000).

2.2. Agents causaux et pathogénèse

E. coli est une des premières causes de DPS et implique dans la majorité des cas le pathotype ETEC qui est caractérisé par un fimbriae portant une adhésine permettant l'adhérence intestinale et une ou plusieurs des entérotoxines, causant la diarrhée. À travers le temps, les sérogroupes et les virotypes ont variés. Aujourd'hui, les ETEC généralement associés à la DPS sont du séro groupe O149 et sont positifs pour le fimbriae F4 (Gyles et Fairbrother, 2004). Selon Frydendhal (2002), ces ETEC sont généralement hémolytiques et produisent l'alpha-hémolysine, mais le rôle de cette dernière dans la DPS n'a pas encore été démontré. Les EPEC sont aussi impliqués dans la DPS en causant des lésions de type attachant et effaçant (Fairbrother *et al.*, 2005). Moins de 10% des cas de DPS seraient associés ou compliqués par les EPEC.

Les porcelets nouveau-nés ingèrent les ETEC présents dans leur environnement, spécialement à partir des glandes mammaires de la mère et de la cage de mise-bas. L'organisme peut survivre au moins 6 mois dans le fumier. Les bactéries prennent comme origine les fèces de porcelets ayant la diarrhée, de porteurs asymptomatiques et de la truie (Gyles et Fairbrother, 2004). Le fimbriae permet l'adhésion de la bactérie à des récepteurs spécifiques de l'intestin et la colonisation des parois intestinales. Les toxines thermosensibles (Heat labile) et/ou thermostables (Heat stable) causent une entérite aiguë avec de la diarrhée aqueuse. Les signes apparaissant habituellement dans les 10 premiers jours post-sevrage pour une durée de 1 à 5 jours. Dans les cas plus sévères, l'animal est retrouvé mort sans signes cliniques apparents. Ces cas sont nommés colibacillose entérique compliquée par un choc toxique. Lors de cas moins aigus, on peut observer une légère perte de la condition générale, de la déshydratation et une diarrhée liquide. La diarrhée varie en consistance de très liquide à pâteuse avec une variété de couleur (gris/blanc, jaune et vert) et est normalement exempte de sang frais et de mucus (Straw *et al.*, 2006). Un taux de

mortalité élevé de 25% peut être observé lorsque aucun traitement n'est apporté (Gyles et Fairbrother 2004).

2.3. ETEC F4-positif (F4+)

Les isolats ETEC possèdent la capacité de produire une ou plusieurs adhésines fimbriaires (F4 [K88], F5 [K99], F6 [987P], F41, F17 et/ou F18 [F107]) dont les plus fréquemment rencontrés en Amérique du Nord dans les cas de DPS sont F4 et F18. Au Québec, le fimbriae F4 est l'adhésine généralement retrouvé aujourd'hui chez les ETEC associées aux cas de DPS porcins, et les sérovirotypes prédominants sont O149:LT:STa:STb:EAST1:Paa:F4 et O149:LT:STb:EAST1:Paa:F4 (Fairbrother *et al.*, 2005). Il existe 3 variants antigéniques du F4, soit ab, ac et ad, F4ac étant de loin le plus associé à la DPS (98 % des cas) à travers le monde (Fairbrother *et al.*, 2005). Les ETEC F4 + sont associés à la diarrhée chez les porcelets en maternité et chez les porcs sevrés (Fairbrother *et al.*, 2005).

2.3.1. Fimbriae F4

Le terme fimbriae indique un groupe d'appendices protéiniques de surface, flexibles et d'un petit diamètre (2-4 nm). Par contre, il a été démontré qu'ils peuvent être larges, rigides et condensés selon le milieu dans lequel ils se retrouvent, donc la morphologie *in vivo* du fimbriae F4 n'est pas connue (Van den Broeck *et al.*, 2000). L'antigène F4 (27,5 KDa) a été décrit pour la première fois par Orskov *et al.* en 1961 sous le terme erroné de K88, parce qu'on le croyait être un antigène capsulaire (K). Dix gènes, désignés *faeA* à *faeJ*, correspondant aux polypeptides FaeA à FaeJ ont été identifiés comme étant impliqués dans la biosynthèse du fimbriae F4. Ces gènes sont situés sur des plasmides de haut poids moléculaire non transférables par conjugaison, contrôlant sa synthèse et contiennent souvent aussi les gènes de certaines toxines causant la diarrhée (Verdonck *et al.*, 2004a, Torres *et al.*, 2005). Le fimbriae F4 est composé de plusieurs centaines de copies de la

sous-unité majeure protéinique FaeG, formant une chaîne polymérique, cette dernière créant la structure conférant la spécificité antigénique. L'unité FaeG du fimbriae F4 est la sous-unité majeure qui possède l'adhésine (Fairbrother *et al.*, 2005). Une unité fimbriaire est aussi composée de plusieurs sous-unités mineures. Les sous-unités du fimbriae sont principalement assemblées par des molécules directrices, identifiés par leurs rôles, dont la molécule portière FaeD (usher), chaperonne FaeE et des composantes structurales mineures, FaeC, FaeF, FaeH et FaeI, du corps fimbrial (Van den Broeck *et al.*, 2000). L'assemblage se divise en trois étapes : la translocation des sous-unités à travers la membrane interne, l'interaction des sous-unités avec le chaperon dans le périplasme et la translocation des sous-unités à travers la membrane externe par le portier (Verdonck *et al.*, 2004a) (figure 2)

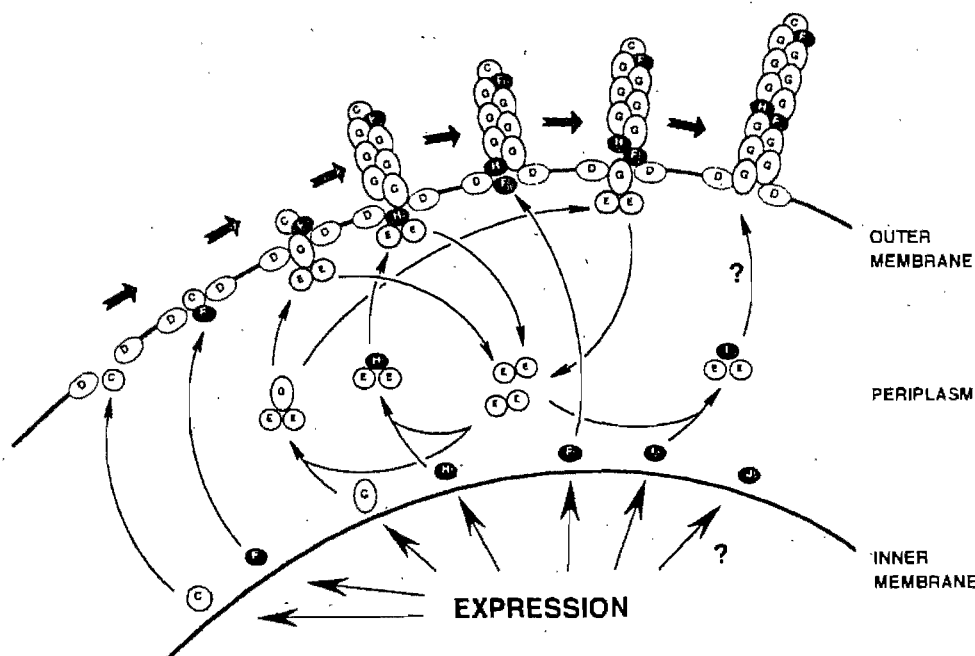


Figure 2. Assemblage des protéines dans la biosynthèse des fimbriae F4. C;D;E;F;G;H;I et J réfèrent à FaeC-FaeJ. Tiré de Van den Broeck *et al.*, (2000).

La régulation de l'expression de l'opéron F4 est liée à plusieurs facteurs dont la température, le pH et la composition de l'environnement (dans l'hôte ou à l'extérieur de celui-ci) dans

lequel se trouve la bactérie (Van den Broeck *et al.*, 2000). Les conditions de l'expressions maximales du gène du fimbriae F4 sont à une température de 37 °C, un pH entre 6,5 et 8,0 et vers la fin de la croissance exponentielle de la bactérie (Verdonck *et al.*, 2004a).

2.4. Récepteurs du fimbriae F4

La nature du récepteur porcin à F4 n'a pas encore été caractérisée, mais plusieurs molécules candidates de différentes grosseurs et de différentes natures dans la bordure en brosse et dans le mucus ont été suggérées. Il apparaîtrait que le récepteur serait un mélange de glycoprotéine et glycolipide (Jin et Zhao, 2000). Les variantes antigéniques de F4 présentent des capacités de liaison spécifique puisque certains porcs sont susceptibles aux trois types (ab, ac et ad), à deux types (ab et ac ou ab et ad), ou à seulement un type (ab ou ad) et finalement, certains sont résistants aux trois types (Fairbrother *et al.*, 2005). D'autres facteurs pouvant affecter la capacité d'attachement sont l'âge, la race, le phénotype du porc et le segment intestinal. En général, les récepteurs de la bordure en brosse sont indépendants de l'âge, tandis que ceux retrouvés dans le mucus diminuent avec l'âge jusqu'à l'âge de 6 mois, période où il n'y a plus de liaison démontrée pour le mucus. La quantité de récepteurs varierait selon le site dans l'intestin. La partie centrale du petit intestin (le jéjunum) semblerait être l'endroit où la quantité serait la plus élevée. Les parties proximales et distales du petit intestin possèderaient aussi des récepteurs F4, par contre, les récepteurs seraient absents dans le caecum et le colon. Il existerait aussi des variations à l'intérieur d'un même segment intestinal (jéjunum proximal, médial et distal) (Jin et Zhao, 2000; Van den Broeck *et al.*, 2000).

Dernièrement un PCR-RFLP a été mis au point pour déterminer le statut génotypique des porcs pour le récepteur F4. La technique est employée avec un échantillon d'ADN, et permet de déterminer le statut de l'animal pour la présence ou l'absence du récepteur F4. Contrairement aux autres méthodes d'identification du statut pour le récepteur F4, telle que

l'adhésion du fimbriae F4 aux vésicules de la bordure en brosse, qui nécessite l'extraction d'une partie de tissu intestinal, le PCR-RFLP a comme avantage de pouvoir déterminer le statut d'un animal vivant. Cette technique est donc pratiquée lors d'expériences *in vivo*, permettant de diminuer la quantité d'animaux utilisée (Jensen *et al.*, 2006).

Le rôle fondamental du récepteur F4 chez le porc lors d'infection aux ETEC F4+ a été démontré par Van den Broeck (1999b) lors de la comparaison de la réponse immunitaire des individus récepteurs F4 positifs (RF4+) en contraste avec des individus récepteurs F4 négatifs (RF4-). Contrairement aux individus F4R+, aucun Ac systémique et mucosal spécifique pour F4 n'a été détecté chez les animaux F4R- après deux vaccinations, indiquant ainsi la nécessité du récepteur dans l'induction d'une réponse immunitaire après immunisation orale.

2.5. Pathogenèse ETEC F4+

Les ETEC entrent dans l'animal après leurs ingestions et colonisent le petit intestin par l'attachement du F4 avec son récepteur spécifique de la bordure en brosse de l'épithélium intestinal ou de façon non spécifique dans le mucus à la surface de l'épithélium. Ensuite, il y a prolifération bactérienne rapide dans le jéjunum et l'iléon pouvant atteindre 10^9 bactéries par gramme de fèces. Les ETEC F4+ colonisent toute la section du jéjunum et de l'iléon (Fairbrother *et al.*, 2005). L'ETEC est habituellement située entre une demi et une largeur de bactérie de l'épithélium (espace comblé par les fimbriae) et colonise les cryptes et couvre la pointe de la villosité. Le relâchement d'une ou plusieurs entérotoxines contribue à l'augmentation de la sécrétion de chlorure, la baisse d'absorption de sodium, et par conséquent une perte d'eau massive dans la lumière intestinale (Fairbrother *et al.*, 2005). Les colibacilloses entériques avec chocs sont probablement dues à un relâchement rapide de lipopolysaccharide (LPS) contenant le lipide A (responsable des symptômes de choc) et entraînant une surproduction de cytokines inflammatoires (TNF- α , IL-1 et IL-6) affectant la

perméabilité vasculaire de l'hôte. L'infection par les ETEC peut aussi causer une septicémie secondaire, probablement par endocytose des cellules épithéliales intestinales ou le passage des ETEC entre les espaces intercellulaires (Gyles et Fairbrother, 2004).

Généralement, il n'y a pas d'autres lésions microscopiques consécutives associées à l'adhésion des bactéries à la muqueuse intestinale. Dans les cas de complication par choc, on peut observer des microlésions hémorragiques dues à une entérite, de la congestion et de la thrombine fibrineuse micro vasculaire, et finalement, de la nécrose des villosités dans la muqueuse de l'estomac, du petit intestin et du colon (Gyles et Fairbrother, 2004).

2.6. Prévention et contrôle

Plusieurs avenues sont présentement explorées en ce qui concerne la prévention et le contrôle de la DPS causée par des ETEC. Un regain d'intérêt pour la diversification des méthodes est impératif avec l'augmentation de l'antibiorésistance. L'antibiothérapie étant l'une des seules méthodes efficaces pour traiter la DPS. Les alternatives présentées ici sont: La sélection d'animaux résistants, l'immunothérapie active et passive, et la médication chimique et organique préventive. Actuellement, le croisement d'animaux résistants à F4 (i.e. F4R-) dépend beaucoup du développement de méthode fiable de détection du loci exprimant le récepteur. Dernièrement, des méthodes de caractérisation des polymorphismes génétiques associés au gène MUC4 ont été proposées par Jensen *et al.*, (2006), comme étant associés à la résistance aux ETEC F4+. Toutefois, il est important de considérer la possibilité de co-sélection de traits indésirables lors des croisements et les répercussions du manque d'immunisation passive chez les porcelets hétérozygote au loci du récepteur F4 (Fairbrother *et al.*, 2005). L'immunisation passive est l'ajout d'Ac spécifiques au pathogène dans la nourriture de l'animal et agit comme une immunisation fournie par le lait maternel. Deux types de supplémentations ont été étudiés : le plasma séché et pulvérisé et la production d'Ac spécifiques dans le jaune d'œuf. Le plasma est efficace mais son coût

est prohibitif. Par ailleurs, les anticorps produits à partir des oeufs démontrent une efficacité mitigée. La médication préventive est courante dans les fermes. Parmi les solutions plus populaires, et de moins en moins efficaces, on retrouve l'administration d'antibiotiques qui est de plus en plus controversée étant donné le développement de résistance. L'oxyde de zinc à de fortes doses offre une alternative intéressante aux agents antimicrobiens. Cependant, il est associé à des problèmes potentiels de pollution environnementale par des métaux lourds. L'utilisation de probiotiques, qui favorise un type de flore intestinale particulier, agit comme compétiteurs exclusifs et s'avère une alternative intéressante. Cependant, leur efficacité est encore à ce jour mitigée (Fairbrother *et al.*, 2005). Finalement, l'utilisation des vaccins composés de bactéries vivantes ou de sous-unités bactériennes est avantageuse puisque ces vaccins peuvent générer une réponse durable et efficace augmentant ainsi les capacités immunitaires de l'animal face à un pathogène spécifique. Ces vaccins ont surtout l'avantage de stimuler localement le système immunitaire de l'hôte lorsque administrés oralement. Pour ces raisons, la vaccination orale est une approche souhaitable pour la prévention de la DPS chez le porc.

3. Système immunitaire mucosal (SIM)

3.1. Description du SIM

Les surfaces mucosales ont plusieurs mécanismes de défense physiologiques et immunologiques (Stokes et Bailey, 2000). Les mécanismes physiologiques du TGI comprennent le péristaltisme, l'acidité gastrique, les enzymes protéolytiques, le mucus et la flore commensale. Les mécanismes immunologiques des muqueuses sont regroupés sous l'appellation MALT ou «mucosa-associated lymphoid tissue». Cette dernière se divise en 3 systèmes classifiés selon leur fonction : Le GALT «gut-associated lymphoid tissue», le BALT «bronchus-associated lymphoid tissue» et le UALT «urogenital-associated lymphoid tissue». Le GALT est constitué de 4 composantes anatomiques: Les plaques de

Peyer (PP) dans le petit intestin, la lamina propria (LP), les lymphocytes intra-épithéliaux dispersés entre les cellules épithéliales et les follicules lymphoïdes isolés (Huyghebaert, 2004).

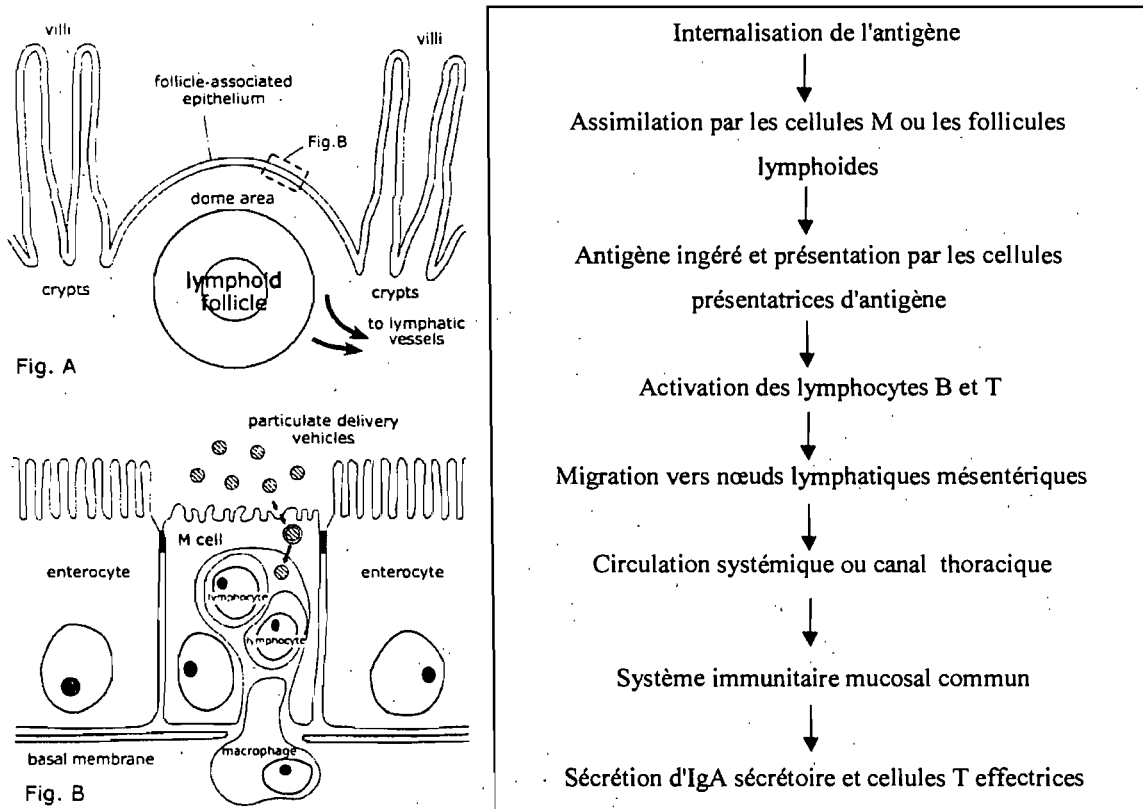


Fig. 3. Structure des plaques de Peyer. Détails de la structure des cellules M (coté gauche) et résumé des événements après l'administration orale d'un antigène (coté droit). Adapté de Huyghebaert, (2004).

Les PP sont des agrégats de follicules recouverts d'une couche épithéliale spécialisée, aussi appelée lymphoépithélium ou FAE (Follicule associated epithelium). Les PP se développent en même temps que la croissance rapide du porc au sevrage. Les follicules des PP (Fig. 3) sont recouverts du lymphoépithélium composé en majorité d'entérocytes ayant une bordure en brosse et de cellules M (20 à 30 %). Les PP du porc sont divisées en 2 catégories : jéjunale et iléocœcale. Celles retrouvées dans le jéjunum sont au nombre

approximatif de 25 à 35 et sont relativement petites tandis que celle près de la jonction iléocaecale est large et unique. Les PP du porc diffèrent dans la production et la migration de leurs lymphocytes. La grosseur des PP du jéjunum varie selon l'âge et l'évolution du contenu microbien du TGI, mais leurs nombres et leurs positions demeurent constants (Stokes *et al.*, 1994). Les cellules M de la FAE sont caractérisées par des microvillosités courtes et irrégulières. Elles sont capables de capter les antigènes de la lumière intestinale et de les amener aux cellules présentatrices d'antigène et aux cellules T régulatrices entre autres (Fig. 3) (Huyghebaert, 2004). Les propriétés et fonctions spécifiques des cellules M ont été vues plus extensivement dans une autre revue de littérature (Kraehenbuhl et Neutra, 2000). Les lymphocytes intra-épithéliaux sont situés dans l'épithélium, entre les entérocytes, et sont séparés de la lumière intestinale par les jonctions serrées et de la LP par la membrane basale. Les lymphocytes intra-épithéliaux seraient, en grande partie, des cellules mémoires ou récemment activées par un Ag. Ils constituent jusqu'à 27 % de l'épithélium (Stokes *et al.*, 1994). La LP est constituée de plusieurs types de cellules immunologiques répartis de façon diffuse contrairement aux cellules immunologiques des PP, plus organisées. La LP est reconnue comme un lieu de sécrétion des Ac sécrétoires par les plasmocytes vers la surface de la muqueuse (Roitt *et al.*, 2002). Un aspect intéressant du développement de la LP est le nombre élevé de cellules sécrétrices d'Ac dans le duodénum, comparativement au jéjunum ou à l'iléon chez les porcelets en bas âge. De plus, ces cellules sécrétrices d'Ac se retrouvent plus fréquemment dans les cryptes que dans les villosités (Pabst et Rothkotter, 1999).

3.2. Induction de la réponse immunitaire

Généralement, l'induction d'une réponse immunitaire débute au niveau des tissus lymphoïdes des PP ou des follicules lymphoïdes isolés. Elle est caractérisée par deux voies de prélèvement antigénique : i) les cellules M des PP et ii) les organes lymphoïdes de la LP et les lymphocytes intra-épithéliaux. La première voie, plus connue, utilise les cellules M,

qui internalisent et présentent l'Ag aux cellules présentatrices d'antigènes (macrophage et cellules dendritiques) dans le dôme sous épithélial des PP. Cette région est enrichie de follicule de lymphocytes B entourée de lymphocytes T, proche des macrophages et des cellules dendritiques (Fig. 4). La présentation de l'Ag via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des cellules présentatrices d'antigènes et la sécrétion d'interleukines amènent l'activation de lymphocytes Th (T auxiliaires) CD8⁺ et CD4⁺. Respectivement, ces deux derniers type de lymphocytes augmentent le nombre de lymphocytes T cytotoxiques et stimulent la différenciation des lymphocytes B en cellules sécrétrices d'IgA et d'IgM (Ogra *et al.*, 2001). La deuxième voie d'échantillonnage implique l'épithélium normal et est moins bien connue. Elle impliquerait un prélèvement antigénique par des cellules dendritiques présents sous l'épithélium via des dendrites projetés dans la lumière intestinale et vers le cortex de la villosité (Fig. 4) (Kelsall et Rescigno 2004, Bailey *et al.*, 2001, Haverson *et al.*, 2000)

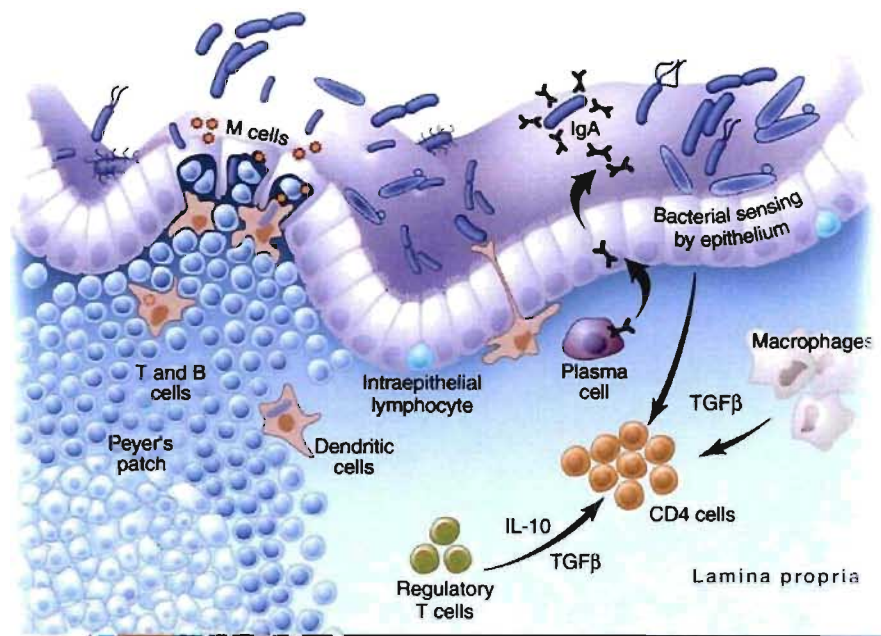


Fig. 4. Échantillonnage antigénique et interactions cellulaires subséquentes dans la paroi intestinale. Tiré de Mac Donald et Monteleone, (2005)

Suite à l'acquisition de l'Ag et à l'activation des cellules présentatrices d'antigène, les plasmocytes migrent vers la LP, site effecteur des tissus de la muqueuse. Cette migration passe par les nœuds lymphatiques mésentériques où la différenciation et la maturation des plasmocytes continuent. Les nœuds sont aussi le lieu où les cellules B mémoires sont stimulées par des cellules présentatrices d'antigène ayant été activées par l'Ag et ayant subséquentement migrées. Plusieurs études ont démontré que l'induction de la muqueuse à un endroit peut provoquer la production de cellules sécrétrices d'Ac dans la muqueuse locale, mais aussi dans d'autres muqueuses distantes. Cette intercommunication des muqueuses se nomme le système immunitaire mucosal commun (SIMC) (Huyghebaert, 2004; Saif, 1996). Les anticorps sécrétoires (notamment les anticorps IgA et IgM) sont produits par les plasmocytes dans la sous-muqueuse intestinale et plus particulièrement au niveau des cryptes des villosités. Des Ac IgG peuvent aussi être retrouvés dans la muqueuse, mais leur origine et leur rôle exact reste encore indéterminés. L'isotype IgA est prédominant dans la réponse adaptative intestinale, et est généralement sécrété sous forme de dimère. Ce dimère est rattaché à un récepteur glycoprotéinique présent à la surface basale des entérocytes, formant ainsi une immunoglobuline polymérique (pIgR). Le complexe anticorps-pIgR est ensuite transporté activement par endocytose à travers les entérocytes. De manière à exposer l'Ac à la lumière intestinale où il sera relâché avec le pIgR après que ce dernier se soit scindé de la membrane. À ce stade, le pIgR est appelé composante sécrétoire et sert à protéger l'Ac de la dégradation par les protéases. Les Ac IgA protègent principalement l'intestin en agglutinant les Ag, et en empêchant l'adhérence des bactéries aux surfaces épithéliales. À cause de leur transport à travers les entérocytes, les Ac IgA peuvent aussi jouer un rôle de protection dans la sous-muqueuse, dans les entérocytes et dans la lumière intestinale. Ils agissent aussi comme opsonine, en activant le complément (via la voie alternative et la voie des lectines), et en formant un complexe IgA-Ag qui peut se lier aux cellules phagocytaires (monocyte et macrophage, neutrophile et éosinophile) (Tizard 2004).

L'IgM sécrétoires est un pentamère et est produit majoritairement lors de la réponse primaire (moins nombreux lors de la réponse secondaire), et ils sont particulièrement efficaces à l'activation du complément, l'opsonisation, et l'agglutination (Tizard 2004).

3.2.1. Cytokines

Les cytokines sont des petits peptides qui jouent un rôle central dans la modulation du processus immunologique et inflammatoire. Elles sont principalement sécrétées par les lymphocytes et les macrophages, mais aussi par des cellules considérées externes au système immunitaire dont les cellules épithéliales, endothéliales et les fibroblastes (Pié *et al.*, 2004). Deux types de réponse sont possibles lors d'une réaction immunitaire, et elles sont représentées par l'activation des cellules T auxiliaires; soit vers un type Th1 ou Th2. Ces types de réponses sont souvent associés à un profil de cytokines sécrétées, initiant de l'immunité cellulaire (Th1) ou de l'immunité humorale (Th2) (Fig. 5). Cette dichotomie est appelée paradigme Th1/Th2, et elle est modulée selon le type de pathogène rencontré (Raymond *et* Wilkie, 2004). Finalement, il existe aussi un autre profil de type Th3, qui est associé à une diminution de la réponse immunitaire ou immunosuppression. Ces derniers ne seront pas abordés dans cette revue.

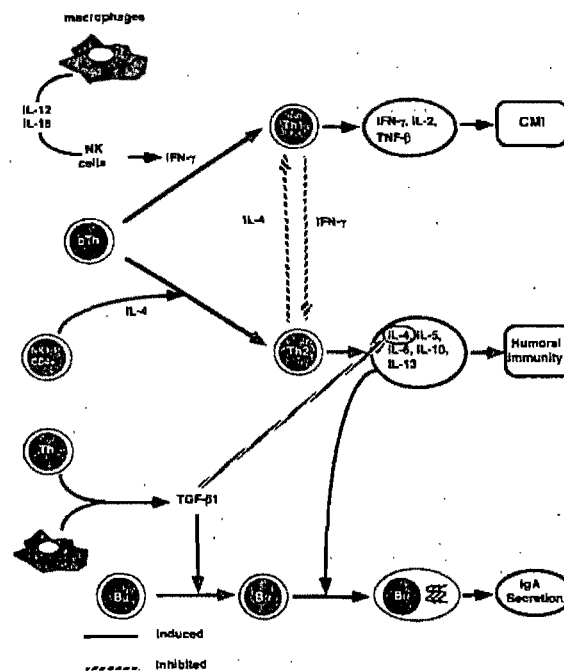


Fig. 5. Paradigme Th1/Th2 et les cytokines impliquées. L'induction de la sécrétion d'Ac IgA au niveau des PP de l'intestin, du porc, est dépendante de l'interaction des cellules B et T avec les cellules dendritiques des follicules lymphoïdes. Après cette interaction, les lymphocytes Th2 agissent sur l'augmentation du pool de cellules B via la production d'IL-4 et la production d'Ac IgA à travers la sécrétion d'IL-5 et d'IL-6. L'IL-5 augmente le nombre de plasmocytes sécréteurs d'IgA, tandis que L'IL-6 augmente le taux de synthèse des Ac. Le transfert d'isotype sIgM vers sIgA des lymphocytes B est sous le contrôle TGF-B. Tiré de van Ginkel *et al.*, 2000.

Les principales cytokines inflammatoires produites par les macrophages porcins activés sont IL-1 (α et β), IL-6, IL-8 et TNF- α . La production de ces cytokines pendant la phase inflammatoire de la réponse innée permet d'activer et de stimuler les lymphocytes T et les macrophages principalement via la production d'IFN- γ . L'IFN- γ mis en présence d'IL-12 stimulerait l'immunité contre les virus entre autres, par l'augmentation de l'immunité de type 1. Cette immunité de type 1 initié et appuyé en boucle rétroactive par l'IL-12 aurait un profond impact sur le système immunitaire acquis. De cette façon l'IL-12 ferait un lien entre l'immunité innée et acquise (Murtaugh *et Foss*, 2002, Raymond *et Wilkie*, 2004).

Parmi les cytokines de type Th2, l'interleukine-4 joue un rôle central, par son effet sur la croissance et la différenciation de cellules B activées, ainsi que sur l'accroissement de l'expression du CMH II et du récepteurs Fc (Bailey *et al.*, 1994). L'IL-4 est une cytokine classique du type 2, mais elle est exprimée en faible concentration chez le porc (Crawley *et al.*, 2003). Récemment, Raymond *et* Wilkie (2004) ont suggéré que l'IL-13 pourrait jouer le même rôle que l'IL-4 chez le porc. L'IL-6 serait impliquée dans la différenciation finale de cellules B activées en plasmocyte et stimulerait la différenciation lorsqu'elle serait en synergie avec IL-4 (Tizard, 2004).

3.3. Développement du système immunitaire porcin

Plusieurs facteurs influençant le développement du système immunitaire du porcelet sont, soit indépendants ou dépendants des antigènes. Parmi ces facteurs indépendants de l'antigène, on retrouve l'âge, l'immunité passive, et le sevrage.

Le porcelet nouveau-né est généralement considéré comme agammaglobulinémique à cause de la structure épithéliochoriale (multi-couche) du placenta, qui ne permet pas le transfert d'Ac maternels pendant la vie fœtale (Olsson *et al.*, 1986). Une petite quantité d'Ac ont été confirmées chez le porcelet fœtus et nouveau-né et sont principalement composées d'anticorps IgM spécifiques pour différents antigènes (Tlaskalova-Hogenova *et al.*, 1994). L'acquisition de l'immunité mucoale du TGI du nouveau-né est grandement influencée par la flore microbienne qui colonise la muqueuse intestinale, généralement dans les huit à dix premiers jours de vie. L'interaction de cette flore colonisant la muqueuse intestinale et les lymphocytes stimulent le développement du répertoire des cellules B par échantillonnage antigénique (Butler *et al.*, 2002). Le système immunitaire mucoal du nouveau-né est quasi absent, même si le système immunitaire systémique est particulièrement bien développé. Le système immunitaire mucoal s'organise pendant plusieurs semaines, l'architecture normale étant atteinte à l'âge de 6 semaines. Une étude de Bianchi *et al.* (1999) sur les cellules

sécrétrices d'immunoglobulines chez des porcs SPF a démontré une stabilisation du nombre de ces cellules à partir de la 12^e semaine d'âge dans la plupart des organes lymphoïdes intestinaux pour tous les isotypes. De plus, les cellules sécrétrices d'IgM sont prédominantes dans les organes lymphoïdes intestinaux jusqu'à 12 semaines d'âge quand les cellules sécrétrices d'IgA deviennent plus abondantes. Ces Ac IgM ont une faible adhérence à la muqueuse et une forte capacité d'activation du complément, ce qui les rend plus aptes à opsoniser (Salmon, 1999).

3.3.1. Immunité passive

Pour compenser l'absence de protection immunitaire par le passage transplacentaire d'Ac et de leucocytes maternels sériques aux nouveau-nés, la truie fournit une immunité passive par le transfert d'Ac et de leucocytes via le colostrum et le lait. Compte tenu du développement tardif des mécanismes de défenses locaux chez le porcelet et que ce dernier n'acquiert un niveau de lymphocytes B comparable à celui de l'adulte qu'à environ 30 jours d'âge, les lymphocytes transférés du colostrum joueraient un rôle de signalisation positive ou négative sur la reconnaissance antigénique et le développement du système lymphoïde (Tuboly *et al.*, 1988).

Après l'absorption systémique des Ac (surtout les IgG), le transfert d'Ac du colostrum et du lait continue de conférer une protection locale pour le porcelet. La protection locale conférée par l'immunité lactogénique chez le porc transmise par le lait est généralement associée à la forme S-IgA (après 4 semaines d'âge). Ces Ac exhibent généralement une spécificité pour les Ag et micro-organismes présents dans les intestins de la truie, cette spécificité étant nommé lien entéro-mammaire (Salmon, 1999).

3.3.2. Impact du sevrage sur le développement du SIM porcin

Le sevrage cause des changements dans la structure et la fonction (biochimique et histologique) du petit intestin, comme l'atrophie des villosités et l'hyperplasie des cryptes. Ces changements amènent une diminution de la digestion et de l'absorption des nutriments, contribuant modestement à la DPS (Mei *et Xu*, 2005; Sarmiento *et al.*, 1988). En 2001, Solano-Aguilar *et al.* rapportaient que les lymphocytes de la muqueuse de l'iléon étaient les plus affectés par le sevrage. Les PP de l'iléon et les nœuds lymphatiques mésentériques joueraient un rôle prépondérant dans la réponse immunitaire pendant le développement initiale des cellules lymphoïdes. Ces informations sur le sevrage sont importantes pour les vaccins administrés en deux doses pour obtenir une stimulation locale du système immunitaire efficace pendant cette période de stress. La susceptibilité aux infections aux ETEC F4+ est forte durant cette période (Solano-Aguilar *et al.*, 2001). Bianchi *et al.* (1999) ont démontré que le temps du sevrage (précoce ou tardif) des animaux avait un effet sur l'augmentation du nombre de plasmocytes dans les tissus intestinaux. Ces cellules ont un potentiel d'expansion après une stimulation local antigénique (Solano-Aguilar *et al.*, 2001). Le sevrage a aussi un impact sur la production des cytokines. Ainsi, Pié *et al.* (2004) ont démontré un effet pro-inflammatoire transitoire sur les cytokines lors du sevrage. Conséquemment cet état pouvait affecter l'absorption de nutriments et l'absorption d'antigènes, contribuant ainsi à l'infection bactérienne (Pié *et al.*, 2004; Mei *et Xu*, 2005).

4. Réponse immunitaire spécifique aux fimbriae F4

4.1. Réponse immunitaire aux vaccins F4 parentéraux

Les vaccins constitués de fimbriae F4, F5 et F6 sont couramment administrés de façon intramusculaire, à la truie gestante pour augmenter le niveau d'Ac spécifiques aux fimbriae dans le colostrum et le lait afin de protéger le nouveau-né contre les infections aux ETEC. Généralement, ces vaccins sont efficaces pour contrôler la diarrhée néonatale, mais ils

déplaceraient la période de susceptibilité des porcelets aux infections de la 1^{er} semaine à la 2^e ou 3^e semaines post-partum (Moon *et* Bunn, 1993). Bianchi *et al.* (1996) ont observés qu'une vaccination intramusculaire avec des fimbriae F4 chez des porcelets suivie d'une infection avec un ETEC F4+ virulent diminuait l'effet protecteur telle que démontré par une suppression de la réponse mucosale suite à l'immunisation. L'immunisation par la voie parentérale des porcelets avec des fimbriae F4 purifiés stimule une réponse humorale systémique composé d'Ac IgG et IgA, tandis qu'il est préférable d'activer le système immunitaire mucosal et d'induire une réponse locale en Ac sécrétoires IgM et IgA afin d'obtenir un effet protecteur (Van den Broeck *et al.*, 1999a).

4.2. Réponse immunitaire aux vaccins F4 oraux

4.2.1. Procédures d'administration des fimbriae F4

Généralement, les vaccins constitués de protéines purifiées génèrent deux types de réponses selon l'état de naïveté des cellules face à la reconnaissance de l'antigène administré. La réponse primaire est caractérisée par une période de latence relativement longue avant l'apparition d'anticorps, d'une faible amplitude de production d'Ac qui ne confèrent pas une protection efficace, et d'une décroissance rapide du titre d'Ac. La réponse primaire est principalement composée d'Ac IgM. Par contre, la réponse secondaire "booster" ou anamnétique est plus rapide, plus forte et plus durable et elle comprend surtout des Ac IgG ou IgA, du moins chez la souris et l'humain (Tizard, 2004).

Chez le porc, une dose d'antigène F4 trop élevée pourrait créer un état de tolérance orale. Cet état est caractérisé par un système immunitaire inerte lors de la rencontre avec l'antigène, tel qu'observé pour un antigène alimentaire. Cet état est souvent due à une exposition antérieure à l'antigène (Cox *et al.*, 2002). Selon ces mêmes auteurs, l'administration orale d'une grande quantité de protéine (par exemple >0,5 mg d'ovalbumine/g poids corporel) supprimerait le système immunitaire systémique,

contrairement à ce qui se passe avec de petites quantités d'Ag (par exemple $<0,005$ mg d'ovalbumine/g poids corporel). Cependant, l'induction de la tolérance orale par l'utilisation de doses élevées de F4 chez des porcs F4R- n'a pas encore été démontré (Cox *et al.*, 2002). Néanmoins, l'administration orale de 2 mg de F4 purifié induit une réponse immunitaire (Van den Broeck *et al.*, 1999a).

Un autre aspect important de l'immunisation est la fréquence de l'administration, car une cédule d'administration trop espacée (plus de 3 semaines) pourrait être inefficace dans des conditions de terrain, puisque la DPS se manifeste rapidement après le sevrage (Felder *et al.*, 2001; Verdonck *et al.*, 2002). Il apparaît important que l'intervalle entre les immunisations primaires et secondaires soit minimal tout en induisant l'immunocompétence contre F4 du SIM de l'animal. Cela semble possible puisque la réponse mucosale suite à l'administration orale contre F4 est très forte et rapide lorsque comparée à celle d'autres fimbriae (Verdonck *et al.*, 2002). Les conditions entourant la procédure d'administration et les résultats obtenus pour les principales études sur la vaccination orale avec F4 sont présentés de façon plus détaillée dans le tableau 2.

Tableau II. Résumé des différents résultats obtenus lors de l'immunisation avec le fimbriae F4 par voie orale chez le porc

| Protocole d'administration | | | | Résultats | | |
|---|--|---|------|--|---|--------------------------------------|
| Âge lors de la 1 ^{re} administration | 1 ^{re} administration (Nbr. de dose X intervalle) | 2 ^e administration (Nbr. de dose X intervalle) | Dose | Réponse immunitaire anti-F4 | Infection expérimentale (Challenge) | |
| 15 sem. | 2 X 48h. | Aucune | 2 mg | Faible augmentation des Ac IgG sériques. Production mucosale de cellules sécrétrices d'Ac IgM principalement. | Aucune | Van den Broeck <i>et al.</i> , 1999a |
| 6 sem. | 3 X 24h. | 3 X 24h. à 8 sem | 2 mg | Forte augmentation des Ac IgG et faible augmentation des IgA sériques après 2 ^e vaccination Détection variable d'Ac IgA dans les fèces après la 2 ^e vaccination | Oui, sans démontrer de protection | Van den Broeck <i>et al.</i> , 1999b |
| 7 jrs. | 3 X 24h. | 3 X 24h. au 21 ^e jrs | 1 mg | Forte augmentation des Ac IgG et IgA sériques après 2 ^e vaccination | Oui, effet de protection marginale | Snoeck <i>et al.</i> , 2003 |
| 7 jrs. | 3 X 24h. | 3 X 24h. au 16 ^e jrs | 2 mg | Forte augmentation des Ac IgG et IgA sériques après 2 ^e vaccination Détection d'Ac IgA et IgM dans les contenus intestinaux après la 2 ^e vaccination | Oui, plus faible excrétion de ETEC F4+ comparé au groupe contrôle | Verdonck <i>et al.</i> , 2004b |

4.2.2. Réponse humorale aux fimbriae F4

Van den Broeck *et al.*, (1999a), ont démontré la production d'Ac IgG (5 jours post immunisation primaire) et IgA (9 jours post immunisation primaire) sérique ainsi qu'une production d'IgM mucosal suivant l'immunisation de porcs 15 semaines d'âge avec un vaccin F4 sous-unitaire (Van den Broeck *et al.*, 1999a). Ces mêmes auteurs (Van den Broeck *et al.*, 1999b) ont aussi démontré une réponse en Ac IgG et IgA sériques, ainsi que des Ac IgA dans les fèces et dans l'intestin dans les porcs de 6 semaines d'âge, suivant l'immunisation avec le vaccin F4 sous-unitaire. Cependant ils n'ont pu démontrer un effet protecteur de l'immunisation suite à une infection expérimentale avec des ETEC F4+ (Van den Broeck *et al.*, 1999b). De plus, Snoeck *et al.*, (2003) ont induit une réponse immunitaire chez des porcelets immunisés oralement avant le sevrage (jours 7 et 21 post-partum), sans conférer l'effet protecteur contre un challenge ETEC F4+. Le manque d'efficacité de la vaccination dans ce cas-ci est possiblement attribuable au système immunitaire immature des porcelets et/ou de l'interférence possible des antigènes vaccinaux avec les anticorps du lait maternel (Snoeck *et al.*, 2003). Finalement, Verdonck *et al.* (2004b) ont pu détecter la présence d'Ac IgM, et dans une moindre mesure des IgA anti-F4 dans les contenus du jéjunum et de l'iléon suite à une immunisation orale avec du vaccin sous-unitaire F4. Ainsi que le démontre les résultats de plusieurs papiers décrits précédemment, il semble nécessaire d'ajouter un adjuvant mucosal approprié pour augmenter l'immunogénicité du fimbriae F4, puisque aucun des essais n'a démontré la capacité de fournir une protection complète contre un challenge ETEC F4 (Verdonck *et al.*, 2005a).

4.2.3. Cinétique de la réponse anti-F4

Van den Broeck *et al.*, (1999a) ont décrit l'apparition des cellules sécrétrices d'anticorps anti-F4 à différents moments et dans différents organes suite à une immunisation orale avec des fimbriae F4 purifiés de porcs de 15 semaines d'âge. Ils ont observé des cellules sécrétrices d'IgM anti-F4 dans les PP très tôt après l'immunisation initiale, soit après seulement 4 jours. Cette réponse initiale était suivie d'une augmentation de cellules

sécrétrices d'IgM et d'IgA anti-F4 dans les nœuds lymphatiques mésentériques. Subséquemment, soit à 9 jours post-immunisation initiale, des cellules sécrétrices d'IgM anti-F4 étaient observées dans le sang pour atteindre les organes lymphoïdes effecteurs de la LP, et les sites effecteurs systémiques (rate et moelle osseuse). À ce moment, un très grand nombre de cellules sécrétrices d'anticorps anti-F4 (tous les isotypes) ont été observé dans les PP (Van den Broeck *et al.*, 1999a). Par ailleurs, il a été démontré que les PP du jéjunum induisaient la réponse immunitaire la plus forte lorsque ces tissus étaient exposés aux fimbriae F4 par injection locale dans le lumen ou lorsque les fimbriae F4 était injectés directement dans les PP du jéjunum par rapport à d'autres segments intestinaux (Snoeck *et al.*, 2006).

4.2.4. Réponse cytokinaire aux fimbriae F4

Très peu d'information est disponible sur la stimulation des cytokines générée par l'exposition des cellules immunitaires aux fimbriae F4. Une étude comparative a démontré qu'il y avait une bonne corrélation entre la production d'ARNm et la production protéique de cytokines chez le porc. L'étude conclut aussi que la stimulation de PBMC porcins *in vitro* avec du fimbriae F4 induisait la production d'IFN- γ (Verfaillie *et al.*, 2001).

5. Vaccins

5.1. Généralités

Il existe plusieurs types de vaccins qui contribuent à contrer les infections bactériennes dont: les microorganismes vivants atténués ou avirulents, les microorganismes tués ou inactivés, les composantes bactériennes purifiées (sous-unitaire), les transporteurs conjugués polysaccharide-protéines, les protéines recombinantes ou l'ADN. Plusieurs vaccins utilisés chez le porc sont composés de microorganismes tués ou de composantes purifiées ou recombinantes de ces microorganismes (Haesebrouck *et al.*, 2004). L'accroissement de la

réponse immunitaire, l'amélioration des interactions mucosales avec les antigènes et l'amélioration des systèmes de livraison sont tous des aspects essentiels aux développements d'un vaccin efficace pour la prévention de maladie. Idéalement, ces composantes devraient (i) protéger le vaccin contre l'élimination physique et la digestion enzymatique, (ii) cibler les sites d'induction, et (iii) stimuler une réponse innée appropriée pour générer une immunité adaptative efficace (Holmgren et Czerkinsky, 2005).

5.2. Vaccins mucosaux

Les voies d'administration mucoale les plus importantes sont les voies orales et nasales. L'administration des vaccins par la voie orale offre beaucoup d'avantages tels que la facilité d'administration, une réduction des effets secondaires, aucune utilisation d'aiguille et le potentiel d'une immunisation par excrétion pour les animaux en contact (Singh et O'Hagan, 2003; Freytag et Clemens, 2005). Un des principaux avantages de l'immunisation mucoale est la capacité d'induire des anticorps sécrétoires (S-IgA ou S-IgM). La dissémination de ces anticorps sécrétoires à des sites mucosaux éloignés et les modes d'action par blocage de l'adhésion, ainsi que la neutralisation des toxines sont aussi des atouts intéressants pour prévenir l'infection et la dissémination du pathogène dans l'organisme (Freytag et Clemens, 2005).

5.2.1. Vaccins oraux sous-unitaire

L'acidité gastrique, les enzymes digestives et la couche protectrice de mucus limitant l'accès à l'épithélium mucoal sont des facteurs qui augmentent la difficulté à produire un vaccin oral compétent, spécialement avec des antigènes inertes (Singh et O'Hagan, 2003). Ces facteurs reflètent deux problèmes majeurs: les Ag délivrés par la voie orale sont généralement peu immunogène et certains antigènes doivent être protégés contre la dégradation. Les vaccins oraux sous-unitaire sont composés en partie de composantes bactériennes protéiniques purifiées ayant une capacité immunogène (O'hagan et Valiante,

2003). Une multitude de composantes bactériennes ont la capacité de stimuler une réponse immunitaire et d'interagir avec les Ac telles que la capsule, les endotoxines, les protéines des flagelles et des fimbriaes, les protéines de la membrane externe, les membranes bactériennes, les exotoxines et certaines protéines du cytosole (Wannemuehler *et al.*, 1994). Tel que discuté auparavant, les fimbriae permettent l'adhérence de la bactérie à la surface de la muqueuse. Cette composante bactérienne est directement associée à l'apparition de plusieurs maladies et par conséquent, est aussi employée comme agent immunogène sous-unitaire, spécialement dans le contexte de la DPS. Puisque la susceptibilité des porcelets à la colonisation intestinale par les bactéries ETEC F4+ dépend directement de l'adhésion du fimbriae F4 à son récepteur intestinal. L'induction d'une immunité acquise face à cet antigène serait une des stratégies les plus prometteuses pour prévenir le développement d'infections aux surfaces mucosales (Snoeck *et al.*, 2003).

5.2.2. Système de livraison macroscopique

Il a été rapporté que le site d'induction majeur du fimbriae F4 est les PP du jéjunum (Snoeck *et al.*, 2006). Il serait donc favorable de cibler la livraison du F4 à ces tissus pour une présentation efficace du vaccin. Ceci peut être accompli à l'aide d'un système de livraison macroscopique. Ceci permettrait de livrer l'Ag directement aux tissus cibles, sans dégradation ou obstruction de l'efficacité de l'Ag. Snoeck *et al.* (2003) rapportaient que l'utilisation d'un système composé de cellulose microcristalline (Avicel) permettait la protection de l'antigène F4 lors du transit, mais avec des résultats démontrant une efficacité marginale pour empêcher la colonisation du tractus gastro-intestinale par les ETEC F4+. La même équipe a aussi démontré que la dissolution de l'excipient avec un enrobage pouvait interférer avec les propriétés adhésives de l'antigène F4 (Huyghebaert *et al.* 2005). Un autre excipient composé d'amidon et d'amylose carboxyméthylé (Carboxy Methyl - High Amylose Starch (CM-HAS)), a été testé *in vitro* par Calinescu *et al.* (2007) sous forme de comprimé pour la protection du fimbriae F4 purifié dans une situation mimant le TGI à l'aide de milieux gastriques et intestinaux simulés. Le système de livraison est composé à 70% d'amylose et de 30% d'amylosepectine. Son fonctionnement est basé sur l'hypothèse

que les groupements carboxylés protonés échangeraient des cations pour des protons en milieu acide conférant ainsi un tampon local autour du comprimé et garantissant l'intégrité de la structure compacte. Cependant, lorsque le comprimé se retrouverait en milieu neutre ou légèrement alcalin l'inverse se produirait et les groupements carboxylés protonés changeraient des protons pour des cations, facilitant l'hydratation et la dissolution de la matrice libérant ainsi les agents bioactifs (Calinescu *et al.*, 2005). Les résultats ont démontré une très bonne stabilité du fimbriae F4 dans le CM-HAS, après 2 heures d'incubation dans le milieu gastrique en présence de pepsine, lorsque comparé à l'antigène libre, ce dernier étant presque entièrement digéré. De plus, l'excipient conférait une protection de 90% des fimbriaes contre la dégradation associée aux enzymes et au liquide gastrique (Calinescu *et al.*, 2005, 2007). Lors d'essais en milieu simulé intestinal, le fimbriae F4 était libéré progressivement pendant une période pouvant aller jusqu'à 5 heures, sans être affecté par la présence de pancréatine. Ainsi, les fimbriaes pourraient potentiellement garder leurs capacités de liaison aux récepteurs F4 essentiel à l'induction d'une réponse immunitaire anti-F4 (Calinescu *et al.*, 2007). Pour une compréhension plus approfondie du fonctionnement du système et de ses propriétés, se référer aux articles suivants: Muhlbacher *et al.*, (2004), Muhlbacher *et Mateescu*, (2005), Calinescu *et al.*, (2005; 2007).

5.3. Adjuvants

Les vaccins sous-unitaires amènent généralement le développement d'une plus grande et plus durable réponse immunitaire spécifique à l'Ag, lorsqu'ils sont en présence d'un adjuvant, grâce à l'activation immunitaire primaire (souvent innée). La reconnaissance des composantes bactériennes pathogènes, par la voie indépendante de l'antigène du système immunitaire inné fournit trois avantages cruciaux : i) initiation rapide de la réponse immunitaire (inné et adaptative), ii) création d'un environnement propice à la reconnaissance de l'antigène par l'inflammation et iii) la co-stimulation des cellules immunitaires. De plus, il en résulte l'établissement d'une première ligne de défense, qui

maintient le pathogène en échec pendant l'orientation et la maturation de la réponse immunitaire. Donc, même si le premier but est d'activer l'immunité spécifique à l'antigène, les vaccins ne peuvent pas le faire efficacement sans activer les mécanismes du système inné associés à la détection des pathogènes (O'hagan *et* Valiante, 2003). Un autre des aspects importants permettant une stimulation immunitaire efficace contre le vaccin est l'utilisation d'un système de livraison.

5.3.1. Adjuvants immuno-stimulateur

Pendant les 10 dernières années, la compréhension du fonctionnement du système immunitaire a considérablement changé avec la découverte de nouveaux adjuvants. Les adjuvants immuno-stimulateurs sont des composantes co-administrées avec des vaccins antigéniques, qui améliorent la réponse immunitaire spécifique à l'antigène *in vivo*. Ils sont constitués de composés naturels ou synthétiques qui activent directement les cellules immunitaires à travers des voies et/ou des récepteurs spécifiques. Ce renouveau dans le domaine des vaccins est propulsé par la croyance que l'activation du système immunitaire innée initie, amplifie et dirige la réponse immunitaire spécifique à l'antigène pour obtenir une forte réponse adaptative (O'Hagan *et* Valiante, 2003; Lycke, 2004). Les adjuvants immuno-stimulateurs les plus prometteurs pour la vaccination mucosale sont les CpG synthétiques hypométhylés et les entérotoxines de *E. coli* et de *V. cholera* (Freitag *et* Clements, 2005).

5.3.1.1. Toxine choléra

Les adjuvants mucosaux les plus puissants et les plus étudiés sont les entérotoxines LT (sensible à la chaleur) de *E. coli* et CT (toxine cholera) de *V. cholera*. Ces toxines existent sous forme native, mais aussi sous plusieurs formes manipulées génétiquement pour diminuer leurs toxicités (mutant LT et CT). Récemment, des chimères des deux entérotoxines (CT-A/LT-B et LT-A/CT-B) ont démontré la capacité d'induire une réponse

des cellules B spécifiques à l'antigène de type 1 ou 2, qui est dictée par l'origine de la sous-unité B (Yuki *et* Kiyono, 2003). L'utilisation chez le porc de CT en petite quantité (50 ug) associée à une plus grande quantité de CT-B (1 mg) a permis de générer une réponse immunitaire appréciable contre CT-B. Par contre, elle n'a pas réussi à induire les mêmes résultats sur des protéines hétérologues y étant associées (Foss *et* Murtaugh, 1999). Puisqu'il existe de l'information déjà publiée sur les effets positifs de l'emploi de CT et du fimbriae F4 (Verdonck *et al.*, 2005a) et qu'elle est disponible commercialement, nous ne traiterons que des effets de la toxine choléra pour la suite de la recension. Car, la toxine LT est difficilement obtenue par purification dans un contexte expérimental et est obtenue seulement en petites quantités. CT est une macromolécule composée de deux sous-unités structurellement, fonctionnellement et immunologiquement différentes, A et B. La sous-unité B agit au niveau de la liaison de la molécule avec le récepteur Gm₁ (monosialogangliosides) augmentant son incorporation dans le GALT. La sous-unité A aurait un effet d'adjuvant sur la réponse immunitaire contre la sous-unité B, notamment via la ribosylation-ADP des protéines G résultant par une augmentation de l'AMP cyclique (Foss *et* Murtaugh, 1999). L'exposition mucosale de l'hôte à CT native induirait principalement la production d'Ac IgA mucosal et d'IgG sériques. Généralement chez plusieurs espèces, cette même toxine induirait d'une part des cytokines pro-inflammatoires de type 1 comme IL-1 β , qui préviendrait la tolérance orale et augmenterait la production d'Ac. Par la suite, IL-1 β en présence d'antigène bactérien exogène induirait de l'IL-12, qui stimulerait une forte production d'IFN- γ et créerait un milieu pro-inflammatoire propice à la présentation d'antigène d'où proviendrait potentiellement l'effet d'adjuvant de la toxine choléra (Murtaugh *et* Foss, 2002). D'autre part, une transition via IL-12 de la réponse inflammatoire (localisées dans le GALT) pourrait induire une réponse spécifique à l'antigène en présence de cellules CD4⁺ Th2 par le biais des cytokines IL-4, IL-10 et IL-18 (Murtaugh *et* Foss, 2002). Bien que cette toxine est responsable de l'intoxication causée par ce pathogène chez plusieurs espèces, des doses pouvant aller jusqu'à 100 μ g ont été administrées sans induire d'effets négatifs chez le porc (Foss *et* Murtaugh, 1999). Il a aussi

été observé que l'effet d'adjuvant de CT était dépendant de la dose de celle-ci, ainsi que de la dose de l'Ag administrée telle que démontrée avec KLH comme Ag par Lycke et Holmgren (1986). Récemment, une amélioration de la réponse immunitaire contre la protéine recombinante rFaeG (F4) a été démontrée en présence de toxine choléra native (Verdonck *et al.*, 2005a). Cependant, les mêmes auteurs observaient qu'une réponse immunitaire plus faible a été générée face à la protéine recombinante rFaeG qu'à la protéine F4 native. Cela reflète bien le problème de la faible immunogénicité des vaccins sous-unitaire et encore plus lorsqu'elles sont composées de sous-unités recombinantes (Verdonck *et al.*, 2004b).

5.3.1.2. CpG

Plusieurs nouveaux adjuvants ont été développés suite à la démonstration que l'ADN bactérien avait des effets immuno-stimulateurs sur l'immunité mucosale, dont l'ADN synthétique contenant des motifs dinucléotidiques CpG (cytosine et guanine réunis par un lien phosphodiester) hypométhylé (Vajdy *et al.*, 2004). Le motif CpG inclut les dinucléotides C et G, ainsi que la première ou la deuxième base en 5' et 3' (ex: TACGTT) (Krieg, 2002). Les CpG-oligodésoxynucléotide (ODN) sont bâtis sur deux types de structures : phosphorothioate (PTO ou PS, avec une demi-vie de 48h *in vivo*) et/ou phosphodiester (PO, avec une demi-vie de 5 min *in vivo*), qui affecte la nature de la réponse immunitaire (Th2 ou Th1) et l'assimilation du CpG-ODN. Parmi d'autres caractéristiques importantes dans l'élaboration de CpG, il y a l'espace entre les motifs CpG ainsi que leurs nombres, dont ceux-ci affectent les propriétés des ODN. Les CpG les plus efficaces ont habituellement deux ou trois motifs séparés par deux paires de base (préférentiellement T), et l'ajout de plus de trois motifs optimaux n'augmenterait pas leurs activités. Une longue séquence d'ADN n'est pas nécessaire pour l'activation immunitaire, mais le nombre minimal de base assemblée ayant une activité est de 6 paires de base et ils ont généralement une longueur variable approchant 20 paires de base (Krieg, 2002). Les CpG-ODN peuvent aussi posséder (en 5' et 3') une suite poly G augmentant leur résistance aux nucléases, qui

améliore l'activité du CpG-ODN (Van der Stede *et al.*, 2005). Les cellules B et les monocytes ont le taux le plus élevé d'assimilation des ODN, tandis que les lymphocytes T (CD4 et CD8) et les neutrophiles ont le taux le plus bas (Krieg, 2002). Les motifs CpG sont reconnus par le système immunitaire inné via les toll-like receptor (TLR9), une famille de récepteurs retrouvée principalement sur les lymphocytes B et les cellules dendritiques plasmacytoides (Krieg, 2002). Le mécanisme de signalisation du TLR-9 est plus complexe que les autres TLR, et il est décrit plus amplement dans l'article de Dalpke *et Heeg*, (2004). Brièvement, l'ADN-CpG est absorbé dans un endosome, lieu où le TLR-9 est situé et où il y aura ensuite transduction du signal. On croit que le TLR-9 est amené dans l'endosome via le réticulum endoplasmique (Klinman, 2004).

5.3.1.2.1. Effet des CpG sur le système immunitaire

L'effet d'adjuvant des CpG serait principalement pro-inflammatoire et serait maximisé par sa conjugaison avec un immunogène protéinique en contact physique rapproché (Vajdy *et al.*, 2004; Klinman *et al.*, 2004). En plus de l'induction locale du système immunitaire innée, les CpG généreraient un environnement cytokinaire de type 1, et une activité anti-apoptotique sur les cellules B et les cellules dendritiques. Les CpG auraient aussi un effet positif sur la prolifération des cellules B et la sécrétion d'Ac spécifique à l'antigène associé à l'adjuvant, potentiellement via une augmentation de l'expression des molécules co-stimulatrices et des CMH II, améliorant la présentation des antigènes (Freitag *et Clements*, 2005). Certaines des études sur les effets des CpG chez l'hôte confirment que cet adjuvant est plus puissant que l'adjuvant complet de Freund pour induire une réponse de type Th1 avec moins de toxicité (Holmgren *et al.*, 2005).

5.3.1.2.2. Type de CpG

Les CpG-ODN de type A ou D ont une structure mélangée (PTO et PO) et possèdent un motif central Purine-Pyrimidine-C-G-Pu-Py avec des séquences adjacentes palindromiques complémentaires (Krieg, 2002). Le type A induit la production de grande quantité d'IFN- α (interféron de type 1) par les cellules dendritiques plasmacytoides (Fig. 7). Ceci limite la prolifération bactérienne et virale, en partie via une augmentation de l'efficacité phagocytaire des macrophages, mais aussi par l'activation indirecte de cellule NK qui induit la production d'IFN- γ et crée un environnement de type Th1 propice à l'élimination des pathogènes. Cette production massive d'IFN- α induit la maturation des cellules présentatrices d'antigènes (Klinman, 2004). Les CpG de type A seraient aussi impliqués dans une voie indirecte via la production d'IL-12 en synergie avec TNF- α . Ceci stimulerait les lymphocytes T CD4 naïfs à se polariser vers un type Th1, ce qui supporterait l'induction des lymphocytes T dépendant de l'antigène, et subséquemment la production d'Ac (Rothenfusser *et al.*, 2002; Klinman, 2004). Le type B ou K est complètement modifié PTO et possède de multiple répétition CG, qui induit entre autre une prolifération élevée des cellules B, ainsi que la maturation et la migration des cellules dendritiques (Ioannou *et al.*, 2003; Krieg, 2002). Les CpG-B induisent aussi la sécrétion d'IL-10 et d'IL-6 par les lymphocytes B, dont cette dernière interleukine qui est associée à la sécrétion d'Ac IgM par les lymphocytes B (Krieg, 2002). Les CpG-B ont un effet dépendant de la structure (PTO) sur les macrophages et les monocytes, entre autre via l'induction de chimiotactisme sur les macrophages primaires et la production de TNF- α par les monocytes du au squelette PTO. (Krieg, 2002). Ils existent aussi des CpG-C et CpG-N, mais dont nous n'aborderons pas l'information dans cette recension.

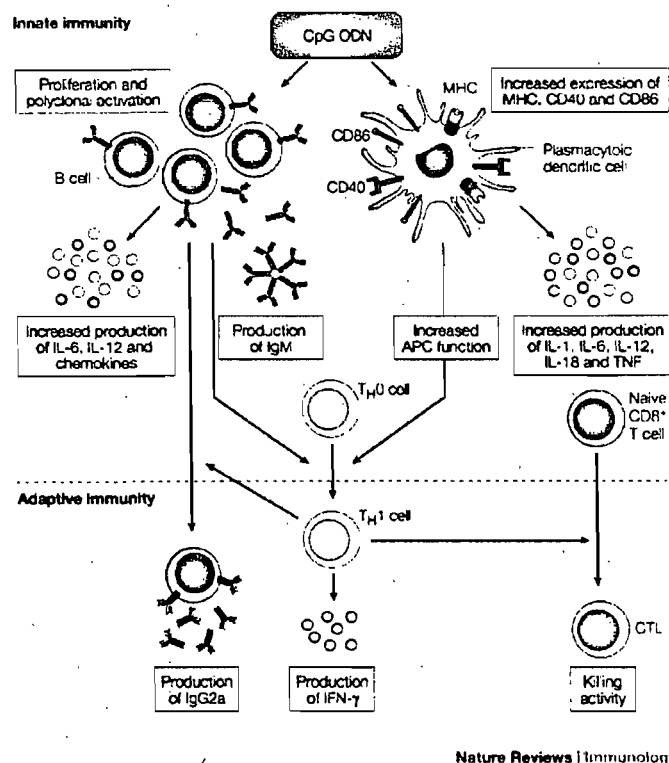


Fig. 7. Mécanisme d'actions des CpG sur la réponse immunitaire innée et acquise. Tiré de Klinman (2004)

5.3.1.2.3. CpG spécifique à l'espèce porcine

L'utilisation de CpG comme adjuvant chez l'espèce porcine commence à être de plus en plus populaire, mais les effets dépendent en grande partie du CpG spécifique employé. Par exemple Danabassis (2006), a utilisé le CpG-ODN 2007 de type B dans un modèle de boucle intestinale chez le porc. Il n'a démontré aucune différence de la réponse immunitaire (décompte de plasmocytes) pour différents tissus intestinaux chez les différents groupes. Cependant d'autres études, dont celles de Zhang *et al.*, (2006), utilisant le CpG D19 comme adjuvant administré par injection avec un Ag, ont démontré un effet significatif notable sur la réponse immunitaire, lorsque la production d'IFN-γ et d'IL-4 étaient regardés *in vivo* chez des porcelets. L'étude de Linghua *et al.*, (2008) a démontré la production locale et

systémique d'Ac spécifique à l'Ag co-administrés (Pseudo Rabies Virus) pour les Ac IgA et IgG₂ respectivement par différents CpG, administré oralement. Leurs résultats ont démontré une stimulation optimale sur la prolifération des PBMC porcin lorsqu'il utilisait une structure mélangée PTO-PO-PTO, comme par exemple le CpG D19 (5'-ggTGCATCGATGCAGggggg-3'). L'utilisation de ce CpG a aussi induit la production d'IgA anti-PRV dans les contenus intestinaux, ainsi qu'une forte production d'IFN- γ en comparaison avec le groupe contrôle. Ces résultats viennent démontrer l'efficacité de l'utilisation du CpG D19 par voie orale. Des essais *in vitro* sur des PBMC porcins ont démontré que l'on était capable d'induire la prolifération de lymphocytes B positifs à l'isotype IgM, induire l'augmentation de l'expression du CMH II par stimulation au CpG D19 (Van der Stede *et al.*, 2005), ainsi que l'induction d'IFN- γ (Li *et al.*, 2004). D'autres études *in vitro* et *in vivo* par injection avec ce CpG de type A, ont aussi démontré un potentiel convaincant avec sensiblement les mêmes résultats dont l'augmentation de l'expression du CMH-II sur culture de lymphocytes, ainsi que l'augmentation de l'expression de plusieurs cytokines dont IFN- γ , TNF- α , IL-12, IFN- α , IL-2, IL-4 et IL-6 (Linghua *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2006; Verfaillie *et al.*, 2005; Guzylack-Piriou *et al.*, 2004; Kamstrup *et al.*, 2001). Le CpG D19 semblerait être un des CpG, actuellement connus, les plus prometteurs comme adjuvant immuno-stimulateur chez le porc et mériterait donc d'être utilisé dans notre formulation vaccinale.

À la lumière de ce qui a été vu dans la recension de littérature, il nous apparaît important de combler des lacunes sur les notions d'utilisation des CpG comme adjuvant dans les vaccins oraux. Ainsi, il exsistent des défis important, notamment en ce qui à trait à l'administration de vaccin par la voie orale et la caractérisation de la réponse immunitaire associées a l'administration du vaccin. Le choix d'un adjuvant, tel que les CpG, et l'utilisation d'un système de livraison à base de CM-HAS pour vaccin oraux nous semblent pertinent à développer, afin d'améliorer la stimulation immunitaire humorale spécifique au fimbriae F4. De plus, la caractérisation de l'expression de gène de cytokine pour certains tissus clés; lors

de l'immunisation par la voie orale nous semblent des aspects incontournables pour arriver à optimiser l'utilisation du vaccin et prévenir efficacement la DPS chez le porc après le sevrage. Jusqu'à présent, la réponse en anticorps et la production de cytokine dans l'intestin suite à l'administration orale du CpG-D19 avec du fimbriae F4, n'a pas été décrite chez le porc. L'étude entreprise dans ce projet évalue les effets immunostimulateurs du CpG-A D19 et de la toxine choléra native sur la réponse immunitaire du porc, après une administration orale avec le fimbriae F4, incorporé dans un système de livraison de CM-HAS.

Méthodologie et résultats

Article: Oral immunisation with F4 fimbriae and CpG enhances F4-specific mucosal immune response and induces Th1 and Th2 cytokine modulation in swine

B. Delisle ^a, C. Calinescu ^b, M.A. Mateescu ^b, J. M. Fairbrother ^{a*}, and É. Nadeau ^a,

^a Reference Laboratory for *Escherichia coli*, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe (Québec), Canada, J2S 7C6

^b Department of Chemistry and Centre BioMed, Université du Québec à Montréal, C.P. 8888, Succ. A, Montréal (Québec), Canada, H3C 3P8

* Corresponding author, Tel.: [information retirée / information withdrawn] fax: [information retirée / information withdrawn] E-mail address:

[information retirée / information withdrawn]

Cet article est présentement en rédaction pour sousmission ultérieur. Le 1^{er} auteur a apporté une contribution majeure dans la composition de cet article

Abstract

Oral vaccination is a promising solution to prevent the development of enteric infections. In swine, F4-positive enterotoxigenic *Escherichia coli* is the major bacterial cause of post-weaning diarrhea. The development of a subunit vaccine containing F4 fimbriae and a mucosal adjuvant is required for situations where existing live vaccines are not appropriate. Immunisation trials were carried out in swine to evaluate the ability of oral administration of F4 fimbriae supplemented with CpG-A D19 or complete cholera toxin, both formulated with carboxymethyl high amylose starch excipient as monolithic tablets, to stimulate F4-specific immune response. The humoral and cytokine responses were determined by ELISA and semi-quantitative RT-PCR, respectively. The results showed that CpG significantly increased F4-specific humoral response by enhancing IgM and IgG levels in intestinal secretions, and Th1 (IFN- γ , IL-12p40, TNF- α and IL-1 β) and Th2 (IL-4 and IL-6) cytokine production in intestinal tissues. On the other hand, the supplementation with CT did not induce F4-specific antibodies in secretions, although a significant Th1 (IFN- γ , IL-18 and IFN- α) response was detected in tissues. No F4-specific systemic antibodies and intestinal secreted IgA were detected throughout the immunisation trial for all groups. In conclusion, CpG-A D19 could be a promising adjuvant for the development of an oral F4 subunit vaccine.

Keywords: F4 (K88) fimbriae, CpG, Immune response, *Escherichia coli*, Enterotoxigenic, Pig

Running headline: CpG enhances F4-specific response and induces cytokine modulation in pigs

1. Introduction

F4-positive (F4+) enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) infections are a major cause of post-weaning diarrhoea (PWD) in pigs. PWD is associated with mortality, but most often results in reduced weight gain due to severe diarrhoea, which in turn leads to significant economic losses in swine production [1]. The F4 fimbriae are proteinaceous surface antigens composed of repeating subunits [2] and are important virulence factors since they allow the bacteria to bind specifically with their F4-specific receptor (F4R) located on the brush border of small intestinal enterocytes, and then to colonize the small intestine. In North America, PWD is often controlled with antimicrobial agents, but with growing concern with respect to acquired resistance of bacteria to antimicrobials, new approaches need to be developed. Oral vaccination is one of the most promising alternatives to control PWD. Advantages include a strong acquired mucosal response to administered antigen, easier administration procedures, and reduced secondary effects [3]. It is known that F4 fimbriae are a potential oral subunit vaccine candidate. Van den Broeck and al. [4-7], demonstrated that oral immunisation of weaned pigs with F4 fimbriae induced systemic F4-specific antibody responses and F4-specific antibody secreting cells in intestinal tissues. However, the immunisation procedure required large quantities of F4, this antigen not being protected against degradation by enzymes and low pH during gastric transit. This constraint may be overcome by incorporating the F4 into a delivery system, such as carboxymethyl high amylose starch (CM-HAS). The CM-HAS was proposed as matrix

able to protect F4 fimbriae oral vaccine against gastric acidity and pepsin, allowing its subsequent liberation in the intestinal fluid [9]. Thus, the F4 fimbriae were liberated from CM-HAS monolithic tablets over a period up to 5h in simulated intestinal conditions, which correspond to the areas of the intestine which have been shown to be the major inductive sites of the F4-specific antibody response [8]. F4 fimbriae are suitable immunogens because of their role in bacterial adherence and because they elicit a rapid and strong host immune response compared to other fimbriae [9]. The need for large quantities of fimbriae to stimulate an adequate oral immune response [5] may be overcome by supplementation with an adjuvant to boost immune response. Cholera toxin (CT) is a potent and well recognized immunostimulating adjuvant that has been used extensively in oral vaccines [10-12]. CT is a multimeric protein composed of subunits A and B. The B subunit binds the monosialogangliosides present on the surface of mammalian epithelial and hematopoietic cells, whereas the A subunit enters in the cytosol and activates ADP-ribosylation of G protein which elevates cyclic AMP (cAMP). This elevation of cAMP is described as being the result of the CT adjuvant activity [13]. CpG-ODNs are another potent immunomodulatory class of molecules used as mucosal adjuvants in vaccine formulations [14]. CpGs act through their interaction with pattern recognition receptors (PRRs) on immune cells and are recognised as danger signals that lead to the stimulation of the innate and adaptive host immune defence system. Several studies have examined the effect of CpG-A D19 either *in vitro* or *in vivo* in pigs. Kamstrup et al. [15] were the first to demonstrate *in vitro* that the CpG-A D19 stimulates the proliferation of peripheral blood

mononuclear cells (PBMC) with increased production of IL-6, IL-12 and TNF- α (alpha). A subsequent study has shown an increase in levels of INF- γ (gamma) [16]. Although CpG type-A is usually associated with the stimulation of Th1 cells by production of high levels of IFN- α [17], Van der Stede et al. [18] showed *in vitro*, that CpG-A D19 can also stimulate B-cell proliferation and enhance expression of MHC II. They also demonstrated the capacity of intramuscular administration of CpG-A D19 to enhance F4-specific proliferation of PBMC in pigs [19]. Recently, Zhang et al. [20] demonstrated the ability of a subcutaneously administered equivalent of the CpG-A D19 containing multiple CpG motifs, to stimulate the innate immune system in weaned pigs as manifested by an enhanced proliferation of PBMC and high levels of IFN- γ in the serum. To date, the adaptive response and cytokine production in the intestine following oral administration of CpG-A D19 with F4 fimbriae, has not yet been described in pigs.

The present study evaluated the immunostimulating effects of CpG-A D19 and CT on the immune response after oral administration in pigs with F4 fimbriae antigen, formulated with CM-HAS, as polymeric delivery system.

2. Materials and methods

2.1. Determination of F4R-positive piglets

To identify F4R-positive pigs to be included in the immunisation assays, whole blood was collected from 2 weeks old nursing piglets in the maternity using tubes containing EDTA. Complete genome DNA was extracted from whole blood using a Qiamp DNA mini-kit (Qiagen Inc, Mississauga, Ontario, Canada) and analysed by PCR-RFLP as described by Jensen et al. [21]. A total of 22 of 50 tested piglets were positive for the presence of F4R, and were thus selected and separated in 3 vaccinated groups of 5 pigs/group and one unvaccinated group of 7 animals.

2.2. Animals, housing and necropsy

Twenty-two F4R-positive pigs (Landrace X Duroc) weaned at 28 days of age were included in the immunisation assay. Upon arrival in the animal care facilities, all pigs were treated orally with colistin (150000 U/Kg of body weight/day; Pharmacie D. Bond and F. Beaulac, Actonvale, Québec, Canada) for 5 days, to control ETEC strains potentially present in the intestinal microflora. After 2 days of treatment, pigs were transferred into new isolation units for subsequent experimentation. The presence of F4-positive ETEC in faecal swabs from pigs was examined by PCR on arrival and every three days. Animals

were weighed and divided in 3 vaccinated groups of 5 pigs/group and one unvaccinated group of 7 animals. Feed and water were given *ad libitum*. Blood and faecal samples were collected to determine the immunological (systemic and mucosal) status of animals at the end of the colistin treatment (at day 0), prior to the initial immunisation, and at various intervals until necropsy (at 26 days post-initial vaccination). Immediately prior to the necropsy, pigs were tranquillised with a mixture of 10 mg kg⁻¹ of body weight of ketamine hydrochloride (Biomeda-MTC, Cambridge, Ontario, Canada) and 20 mg kg⁻¹ of xylazine (Bayer, Toronto, Ontario, Canada), then euthanized by intravenous injection of 540 mg ml⁻¹ sodium pentobarbital (Biomeda-MTC, Cambridge, Ontario, Canada). On necropsy, contents of the jejunum and ileum were collected in 50 ml tubes, kept on ice, and then stored at -80 °C until determination of mucosal F4-specific antibodies. Segments of both jejunum and ileum tissues (1 X 2 cm) with (PP+) or without (PP-) Peyer's patches were collected for examination of immunisation effect in different regions of the intestine and mesenteric lymph nodes (MLN) were sampled to characterize mRNA cytokine production. All tissue samples were placed in cryotubes, snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C. Jejunum tissue segments (3 mm transversal section) were also embedded in O.C.T. (Somagen Diagnostics, Alberta, Canada), snap frozen in liquid nitrogen, and stored at -80 °C to confirm the F4-receptor (F4R) status of animals using an F4 indirect immunofluorescence assay [22]. Pigs were cared for in accordance with the Guidelines of the Canadian Council for Animal Care.

2.3. Purification of F4 fimbriae

F4 fimbriae were purified as described previously [23], with some modifications. Briefly, the F4-positive bacteria were centrifuged (at 7000 RPM for 15 min) and pellet was left to stand overnight at 4 °C. The pellet was homogenized twice for five minutes on ice at maximum speed using an X-120 homogenizer (Polyscience, Staufen, Germany), with cooling on ice for five minutes between each homogenization and then centrifuged at 11000 RPM for 20 min. The supernatant was precipitated with 20% ammonium sulphate for 16 to 18h at 4 °C under agitation. The suspension was then centrifuged at 10000 RPM for 1h. The pellet containing the fimbriae was dissolved in PBS and dialysed against water for 7h then against PBS for 16 to 18h. The pH of the suspension was then adjusted to 4 with 2.5% citric acid, agitated for 2h at 4 °C, and centrifuged at 11000 RPM for 15 min. Finally, the pellet containing the fimbriae was lyophilised. The protein concentration of the semi-purified fimbrial preparation was determined by modified Lowry method and the purity was assessed by electrophoresis on 12 % SDS-PAGE gels.

2.4. Synthesis of CM-HAS polymeric material

The CM-HAS was synthesized by etherification of the high amylose starch (Hylon VII) with monochloroacetic acid in an alkaline reaction medium, as described previously by Calinescu et al. (2007) [9]. The degree of substitution (DS 0.93 mmoles functional groups /

g polymer) of CM-HAS was determined by direct titration with 0.1N NaOH solution, as previously described [9].

2.5. F4 fimbriae vaccine preparations

Lyophilised F4 fimbriae were exposed to 5 Kgrey of irradiation (Cobalt 60) to eliminate potential live F4+ bacteria which survived to the purification process. Thus, no bacterial growth was observed following inoculation of irradiated fimbriae onto blood agar and LB broth (Luria-Bertani). No effect of irradiation on ability of F4 to interact with intestinal epithelial cells (from a previously identified F4R-positive pig) was observed by indirect immunofluorescence [22]. In addition, the integrity of irradiated fimbriae was confirmed by SDS-PAGE and western blot. Irradiated lyophilised powder of F4 fimbriae (500 µg of fimbriae per dose), alone or with complete CT (25 µg per dose; Sigma, St-Louis, USA) or with CpG-A D19 (50 µg per dose; 5'-ggTGCATCGATGCAGggggg-3'; Biocorp, Montréal, Québec, Canada) were associated with CM-HAS polymer powder. The monolithic tablets (200 mg) were obtained by direct compression (Carver press) of mixed dry powders at a compression force of 2.5 T/cm². CM-HAS tablets (200 mg) without fimbriae or adjuvant were also prepared for unvaccinated pigs.

2.6. Immunisation procedure

Two oral immunisations were performed. They consisted of the administration of one CM-HAS tablet per day for 3 successive days, from day 1 of the immunisation assay (35 days of age) and from day 14 post-initial immunisation. For the three vaccinated groups, CM-HAS tablets contained: F4 fimbriae only (F4 group), F4 fimbriae with complete CT (F4-CT group) or F4 fimbriae with CpG-A D19 (F4-CpG group). The unvaccinated control group received tablets made of CM-HAS only, without any bioactive agent.

2.7. Detection of F4-specific antibody

2.7.1. Sample preparation

(i) Serum. Blood was taken from the jugular vein the day before the initial immunisation and after 5, 8, 13, 16, 20, 23 and 26 days post-initial immunisation. Whole blood was centrifuged and the serum stored at -20 °C until analysis. (ii) Intestinal contents. At necropsy (after 26 days post-initial immunization), intestinal contents were collected from the jejunum and ileum and stored at -80 °C, until treated as described by Wenneras *et al.* [24] with slight modifications. Briefly, contents were treated by addition of soybean trypsin inhibitor (STI; 100 µg/ml final concentration; Sigma, St-Louis, USA) and EDTA (0.05M final concentration; Sigma) and kept on ice for 15 min. Then, the samples were centrifuged at 1,000 X g for 15 min, and the supernatant was treated by adding phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; 2mM final concentration; Sigma) and left to stand at room temperature for

15 min. Bovine serum albumin (Sigma) and sodium azide (Sigma) were then added to final concentrations of 1 mg/ml and 0.02% (wt/vol), respectively. The intestinal content was freeze-dried and reconstituted at 1:20 the original volume with PBS before analysis by ELISA.

2.7.2. Detection of F4-specific antibody by ELISA

Systemic and secreted intestinal F4-specific antibodies were detected using an indirect ELISA test. Wells of 96-well microtiter plates (Nalge Nunc, VWR International Co., Mississauga, Ontario, Canada) were coated overnight at 4 °C with F4 fimbriae (5 µg/ml in 0.1M carbonate buffer, pH 9.4). Non-specific binding sites were blocked with PBS supplemented with 0.2% Tween-80 (vol/vol). Sera were 1/10 diluted and intestinal contents were diluted to 1/20 of the original volume, then two fold-serial dilutions in PBS, containing 0.2 % Tween-20 (vol/vol) and 3 % BSA (wt/vol), were performed, and plates were incubated for 1h at 37 °C. Optimal dilutions of goat anti-swine IgM, IgG or IgA HRP conjugates (Bethyl Laboratories, Cedarlane Laboratories Ltd., Burlington, Ontario, Canada) were added to wells and plates were incubated for 1h at 37 °C. The substrate ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) was added, and the optical density (OD) was measured at 405 nm after 15min of incubation at 37 °C. Between each incubation step, plates were washed three times with PBS-T (PBS plus 0.2% Tween-20 [vol/vol]). The cut-off values, being the mean OD at day 0 plus 2 times the standard

deviation, were 0.32 for F4-specific IgM and IgG and 0.30 for IgA. The antibody titer was the inverse of the highest dilution which still had an OD higher than the cut-off value. When titers were below the detection limit, the titer was arbitrarily set to the \log_{10} of one-half the detection limit for display purposes and mean calculation [25].

2.8. Porcine cytokine semi-quantitative RT-PCR

RT-PCR was used to semi-quantify mRNA production for 10 cytokines (IFN- α , IFN- γ , TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β , IL-4, IL-12p40, IL-18 and IL-8) in tissues. Approximately 50 mg of frozen tissue was immediately introduced in liquid nitrogen to obtain a dry powder. Then, the tissue homogenate was transferred in a tube containing 1 ml of Trizol (Invitrogen, Ontario, Canada), and extracted as described by manufacturer. The RNA pellet was then resuspended in 25 μ l Promega nuclease free water (Fisher Scientific Ltd., Ontario, Canada) and heated at 65 °C for 10 min. Samples were treated with Turbo DNase (Ambion/Applied Biosystems Canada, Ontario, Canada) according to the manufacturer's protocol, followed by NaAc (10 % sodium acetate) precipitation. RNA samples were resuspended in nuclease free water to obtain approximately 300 ng/ μ l of RNA. Reverse transcription was carried out using approximately 1 μ g of total RNA and primed by random hexamer priming (Roche Diagnostics, Québec, Canada). Other reagents used for reverse transcription included: RNase inhibitor, 10 mM of each dNTP and SuperScript II RT (Invitrogen, Ontario, Canada). At the end of reverse transcription, residual RNA was eliminated by adding 2U of

RNase H (Epicentre Biotechnologies, WI, USA), and sample volume was adjusted to 100 μ l with nuclease free water. PCR was carried out using Biotools Taq enzymes (Biotools B&M Labs. S.A., Madrid, Spain) including 1X PCR buffer (10mM Tris-HCl, pH 9.0), 1.5 mM $MgCl_2$, 10 mM of each dNTP, 100 pmol of sense and anti-sense primers for each cytokine, 2.5U Taq DNA polymerase and 10 μ l of sample cDNA template in a 50 μ l reaction volume. RT-PCR and PCR were performed in a Biometra (Biometra, GmbH, Germany) thermocycler using same primers and conditions similar to those described previously for IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , IFN- γ , cyclophilin [26], IL-12p40 [27], IL-18 [28] and IFN- α [29]. An aliquot of each PCR sample was migrated on 1.8% TBE-agarose gels. Gels were stained with ethidium bromide and photographed using an alpha-imager (Alpha Innotech, CA, USA). The relative amount of each product was determined by measuring the density of the band using BioNumerics software (Applied-maths, Inc.). For each cytokine, the amount of the RT-PCR product was normalized to the value of cyclophilin, a constitutively expressed housekeeping gene used as a standard for each sample.

2.9. Statistics

Differences between groups in IgM and IgG antibody production and in cytokine mRNA expression ratio for combined results of jejunum and ileum were analysed for statistical significance with the General Linear Model (Repeated Measures Analysis of Variance) test.

Combined results for cytokine ratio in jejunum and ileum intestinal tissues were considered as duplicate sampling for statistical analysis.

3. Results

3.1. Absence of serum F4-specific antibody after oral immunisation of pigs

No significant differences in specific anti-F4 IgM or IgA response were observed in the serum of vaccinated (F4, F4-CpG, or F4-CT groups) and unvaccinated pigs through to 26 days after initial oral immunisation (Fig. 1). The IgG serum titers were not determined because pigs came from commercial farms where sows were vaccinated against F4.

3.2. CpG enhances the production of mucosal specific anti-F4 IgM in contents of the small intestines

On necropsy of pigs at 26 days after initial immunisation, we observed a significant increase ($P = 0.01$) in the mucosal anti-F4 IgM titer in small intestinal contents of the F4-CpG group as compared to that of the F4 group (Figure 2). In contrast, the mucosal anti-F4 IgM titer in intestinal contents of the F4-CT group was significantly lower ($P = 0.0004$) than that of the F4 group.

A significant increase ($P=0.04$) of the anti-F4 IgG titer was observed in intestinal contents of the F4 group, as compared to that of the unvaccinated group (data not shown). We also found that anti-F4 IgG titer in intestinal contents of the F4-CpG group was significantly higher ($P=0.0004$) than for the unvaccinated group. Furthermore, the anti-F4 IgG titer in intestinal contents of the F4-CT group was significantly lower ($P=0.002$) than for the F4-group.

Mucosal anti-F4 IgA production was not detected in intestinal contents of any group.

3.3. CpG and CT up-regulate cytokine mRNA in different tissues

We examined cytokine mRNA expression in MLN and in PP-negative and PP-positive intestinal tissues following necropsy at 26 days post initial immunisation to explore mechanisms for the observed modulation of specific mucosal antibody response to F4 fimbriae. No significant difference in expression of cytokines was observed in the PP-positive or PP-negative tissues of the F4 group as compared to the unvaccinated group. However, a significantly greater expression of IL-4 and IFN- γ in both the PP-negative and PP-positive tissues was observed for the F4-CpG group than for the F4 group (Table 1). Other cytokines also involved in Th1 and Th2 response that were significantly up-regulated in the F4-CpG group were IL-12p40, TNF- α and IL-6 in the PP-negative tissues, and IL-1 β in the PP-positive tissues (Table 1).

Pro-inflammatory cytokines significantly up-regulated in the F4-CT group were IFN- γ in PP-negative and in PP-positive tissues, IFN- α and IL-18 in PP-negative tissues (Table 1). Overall cytokine mRNA expression was higher in PP-positive than in PP-negative tissues for IL-6, IL-12p40, IL-10 and TNF- α (data not shown). The mRNA results for cytokine IL-8 showed that it was highly expressed in a constitutive manner with small differences between groups with or without adjuvant in all tissues analysed at 26 days after initial immunisation. All cytokines in MLN were expressed at a similar level in all groups and tissues.

4. Discussion

We have demonstrated, for the first time, an adjuvant effect for CpG when administered orally with purified F4 fimbriae in a delivery system based on CM-HAS monolithic tablet. This effect was manifested by an enhanced F4 specific humoral response, particularly IgM and IgG, in intestinal contents of pigs, a desirable effect for the development of a vaccine stimulating protection against PWD due to ETEC [5]. Van der Stede et al. [19] previously demonstrated an adjuvant effect for CpG-A D19 when co-administered with F4 antigen to pigs by the parenteral route, as manifested by increased F4 *in vitro* stimulated PBMC proliferation and reduced faecal excretion of F4+ *E. coli*, although an effect on adaptive immunity was not shown. Our *in vivo* results complement the *in vitro* results obtained by Van der Stede et al. [18] using the same porcine specific CpG-A D19. These authors reported that culture of swine PBMC with this CpG for 4 days induced IgM⁺ B-cell

activation and increased expression of MHC-II molecules in swine lymphocytes. Moreover, it was also reported that parenteral administration of CpG-A D19 to newly weaned piglets significantly stimulated the proliferation of PBMC and production of IFN- γ in serum, thus enhancing the activation of innate immune system [20].

The finding of a predominance of F4-specific IgM antibodies in the intestinal contents is consistent with F4 oral immunisation results from comparable studies [8, 30]. The predominance of mucosal IgM isotype is supported by a study of Bianchi et al. [31], who found that IgM is more a mucosally related isotype in pigs than in other animal species and that IgM is preferentially expressed in the first 12 weeks of age in specific pathogen free (SPF) pigs. Also, our results are consistent with the finding of a predominance of IgM isotype antibodies following live F4+ ETEC infection, in intestinal secretions of swine during early development of animals [32]. A rapid and massive IgM response as early as 14 days after intestinal immunisation with F4 fimbriae [8], as manifested by an increase in F4-specific IgM secreting cells in the jejunum and ileum PP, might be one mechanism for the development of a protection against F4-associated PWD in susceptible animals. This rapid response would be particularly important in light of the early critical time period susceptibility of animals after weaning [33] and rapid bacterial colonization of the intestines [9].

The observation of a predominantly IgM and IgG anti-F4 response in the current study is consistent with the relative antibody isotype response obtained in intestinal secretions of piglets in the first weeks of life [32]. Our results are further corroborated by other studies where IgG secreting cells were found in the gut associated lymphoid tissue (GALT) after oral administration and jejunum exposure to F4 fimbriae, mainly at 21 days post immunisation (53-56 days of age) [8]. Even though specific anti-F4 mucosal IgG are not recognized as major immunoglobulins involved in mucosal anti-F4 defence, in part because of their susceptibility to protease degradation in gut secretions [34], they might still play an early role in IgA antibody affinity tuning [35] or through passive paracellular transfer and cell surface scavenger sampling of luminal antigens [36].

In the current study, the absence of specific anti-F4 IgA in the intestinal contents of pigs at necropsy, thus 26 days after initial immunisation (60 days old pigs), is not consistent with the results of Verdonck et al. [30], possibly indicating a delayed production of IgA F4-specific antibody response in the pigs in our study. Verdonck et al [30] noted that the induction and isotype switching of IgM to IgA was slower following oral immunisation with purified F4 fimbriae than following live F4+ ETEC infection [9, 30]. Similarly, few specific anti-F4 IgA secreting cells were found in the jejunum and ileum at 21 days after oral immunisation of pigs (53-56 days of age) with F4 fimbriae, in relation to the overall high level of IgM production at same time-point [8].

We examined cytokine expression in regions of the small intestine with or without Peyer's patch in an attempt to gain some insight into the mechanisms for the adjuvant effect of CpG. An interesting finding was an up-regulation of the Th1 cytokine IFN- γ and the Th2-type cytokine IL-6, these being hallmark cytokines of antibody production. Similarly, Yi et al. [37] observed an increased production of IL-6 and subsequent IgM antibody response in mouse B cells stimulated with CpG and IFN- γ , production of the latter being itself induced in T cells by the presence of CpG [38]. In other studies, stimulation with CpG-A D19 led to the increased expression of MHC-II in swine PBMC [39], in B cells [18], and in plasmacytoid dendritic cells also with up regulation of costimulatory factors CD80/CD86 [40]. In the latter cells, high amounts of IFN- α , TNF- α , and IL-12 were also induced. In addition, the significantly higher expression of type 1 cytokines IFN- γ , IL-12, TNF- α and IL-1 β observed in PP-negative and/or PP-positive tissues in the current study is consistent with up-regulation of cytokine mRNA expression observed in swine PBMC following stimulation with CpG D19 *in vitro* or *in vivo* [15, 16, 20, 40]. All of these observations put together tend to indicate that type-A CpG, particularly D19, generates a strong type 1 environment. We have confirmed that a similar response also occurs in the intestinal mucosa in pigs, possibly involving both immune and non-immune cells, following oral administration of CpG, which may explain the observed significantly stronger F4-specific mucosal humoral response.

We confirm in the current study that CpG ODN can stimulate innate and adaptive immune systems in the intestinal mucosa following oral administration to pigs, as previously reported in studies on CpG following parenteral administration or stimulation of immune cells in culture [20, 41, 42]. Since we used a type-A CpG, which is known to polarize lymphocytes towards a Th1 environment, and our results demonstrate a strong adaptive response, we confirm that amongst the types of CpG, at least in our case, type-A appears to stimulate both the Th1 and Th2 environment against F4 fimbrial antigen in the host. Rothenfusser et al. [43] proposed a model for the effect of CpG as assessed by *in vitro* experiments on human immune cells, in which type-A CpG induces elevated levels of IFN- α and TNF- α in plasmacytoid dendritic cells, stimulating NK cells and $\gamma\delta$ (gamma-delta) T cells to produce IFN- γ . Over time, an indirect pathway stimulates IL-12 production supporting antigen specific T cell priming, and, with TNF- α , leading to indirect priming of B cells and strong humoral response. Our porcine *in vivo* results for cytokine expression corroborate those of the *in vitro* experiments in human cells described in this model, strengthening the argument for the use of the pig as a pre-clinical intestinal model for humans [40, 44].

A surprising finding of our study was the increased expression of IL-4, in both PP – containing and –lacking regions. Parenteral injection of the CpG D19 has been reported to have no effect on IL-4 production [20, 45]. CpG D19 administration is also associated with an inhibition of IL-4 production involved in allergic responses, but also enhances IFN- γ and

IL-12 which is consistent with our results for the two latter cytokines [46]. Discrepancies for IL-4 production may be due to the different sites examined, routes of vaccination or *in vitro* vs *in vivo* experimental procedures.

The low antibody and cytokine response following oral administration of F4 fimbriae alone demonstrates the need for an adjuvant to boost humoral mucosal response. The discrepancy between our results and those of other studies [5, 30], where a significant anti-F4 antibody response was observed following oral administration of F4 fimbriae without adjuvant, may be explained by the much higher immunising doses in the latter studies. Our finding that the combination of CpG with small amounts of F4 resulted in the stimulation of significantly higher levels of anti-F4 antibody provides a more cost-effective way of stimulating anti-F4 antibody production. This effect was probably also enhanced by the ability of the CM-HAS matrix to deliver the F4 to a specific absorption window [47]. Another beneficial effect of using the CM-HAS delivery system may be the resultant proximity between F4 antigen and adjuvant when delivered to the antigen presenting cells, this being a prerequisite for CpG adjuvant efficacy [48, 49]. The CM-HAS delivery system also protected the F4 fimbriae against degradation in the simulated gastric fluid [9], thus reducing the amount of antigen and adjuvant necessary to stimulate antibody production and increasing the cost-effectiveness of this approach.

The lack of detectable specific anti-F4 antibody in the sera of orally immunized pigs in our study might indicate that the systemic and small intestine mucosal responses are distinct when only the small intestine surface is exposed to F4 antigen, possibly due to differences in protein diffusion to villous capillaries, as hypothesised by Snoeck et al. [8] to explain lower serum specific antibody levels following colonic immunisation with F4. In addition, following oral administration of F4 without a delivery system, as carried out in other studies [5-7], it is probable that the immunogen would come into greater contact with pre-gut mucosal surfaces i.e. buccal, nasal and larynx associated lymphoid tissues, and would generate a systemic antibody response by contact with small lesions in the gums [8]. Hence, it might be suggested that the low immunisation dose (i.e. 8 fold less than Snoeck et al. [8]) used in our experiments was efficiently taken up into mucosa following slow release during intestinal transit and that little or no excess antigen found its way to systemic routes.

Another surprising finding of our study was the lack of adjuvant effect for CT with respect to mucosal antibody response to F4. This is unexpected, as complete CT is considered as a potent mucosal adjuvant, and an adjuvant effect as manifested by a significantly higher salivary IgA and cellular F4 specific response has already been observed following oral immunisation of pigs with recombinant FaeG (major adhesin of F4) [50] and F4 fimbriae coupled to human serum albumin [51] with co-administration of CT. The difference in results may be explained in part by the use of the CM-HAS delivery system which may have reduced the pre-gut mucosal surface contact of F4, resulting in a stimulation

predominantly of the GALT and less of other mucosal regions, such as the nasal associated lymphoid tissue (NALT) and of systemic regions. Similarly, oral vaccination with non-replicating immunogens such as subunit vaccines is known for poor induction of serum antibodies [8, 52]. In addition, it is possible that salivary antibodies may not accurately reflect enteric immune response [53]. In our study, the mucosal antibody response was examined in intestinal secretions, whereas in the two above-mentioned studies it was measured in the saliva. Another possible explanation for the decreased anti-F4 IgM levels in our study when CT is used, could be a concomitant IgA isotype switching, as CT is known for this effect [54]. No F4-specific IgA production was observed at the time of intestinal content sampling. This may have been combined with a simultaneous decrease in IgM as seen *in vitro* in murine LPS stimulated spleen B cells [12]. In agreement with our results, Foss and Murtaugh [10] found that the adjuvant effect of CT for heterologous proteins following oral administration was variable; no induction of antibodies to keyhole limpet hemocyanin being observed when there was co-administration of CT. Finally, the CT : antigen ratio used for oral administration to animals appears to be important for an effective adjuvant stimulation by CT, this being dose-dependent and proportional to the antigen load [13]. Interestingly, the quantity of F4 fimbriae administered with 25 µg of CT was much lower than that used by Verdonck et al. [50] for the same dose of CT.

Although no adjuvant effect on anti-F4 antibody response was observed in our studies for CT, pro-inflammatory cytokine expression was nevertheless stimulated by the oral co-

administration of CT with F4. In particular, IFN- γ was up-regulated in both PP-containing and PP-lacking regions of the small intestine, suggesting that there was an inflammatory response and thus excluding the possibility of having provoked oral tolerance to F4 fimbriae by immunisation procedure. Oral immunisation with CT in mice has been shown to influence protection against *Helicobacter pylori* through IL-18, a co-regulator of Th1 development associated with IFN- γ production in gastric tissues [55]. Similarly, Th1-type cytokine IL-18 was also upregulated, as well as IFN- α in PP-lacking regions of the small intestine following co-administration of F4 with CT in the current study, providing more evidence of an immunomodulatory effect due to CT, being different to that observed for CpG adjuvant. In swine, it has been shown that the presence of endotoxin with CT and IFN-gamma leads in turn to the expression of high levels of IL-1 and IL-12 [56]. Thus, as both IL-1 and IL-12 are key cytokines of the innate immune system, an increase in their levels creates a pro-inflammatory environment and enhances antigen presentation by antigen presenting cells as an adjuvant function [13]. In addition, IL-12 redirects the pro-inflammatory stimulation to an acquired response against co-administered antigen in the local mucosa. The absence of up-regulation of these cytokines in the small intestines of the pigs in our study would explain in part the absence of specific anti-F4 antibody production in the intestinal secretions in the pigs that were orally immunised with F4 and CT.

In conclusion, our results demonstrate the potential for use of CpG as a mucosal immune adjuvant for oral immunisation of pigs with subunit vaccines and underline the role of a Th1 cytokine environment in its adjuvant effects.

Acknowledgments

We are thankful to Brigitte Lehoux, Clarisse Desautels, Jade-Pascale Prévost Lemyre for technical assistance and Guy Beauchamp for statistical analysis.

This work was supported by grants from Valorisation Recherche Québec and the Research Group on Infectious Diseases of Swine.

References

- [1] Fairbrother JM, Nadeau E, Gyles CL. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases* 2005 Jun;6(1):17-39.
- [2] Van den Broeck W, Cox E, Oudega B, Goddeeris BM. The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. *Veterinary microbiology* 2000 Feb;71(3-4):223-44.
- [3] Freytag LC, Clements JD. Mucosal adjuvants. *Vaccine* 2005 Mar 7;23(15):1804-13.
- [4] Cox E, Van der Stede Y, Verdonck F, Snoeck V, Van den Broeck W, Goddeeris B. Oral immunisation of pigs with fimbrial antigens of enterotoxigenic *E. coli*: an interesting model to study mucosal immune mechanisms. *Veterinary immunology and immunopathology* 2002 Sep 10;87(3-4):287-90.
- [5] Van den Broeck W, Cox E, Goddeeris BM. Induction of immune responses in pigs following oral administration of purified F4 fimbriae. *Vaccine* 1999 Apr 9;17(15-16):2020-9.
- [6] Van den Broeck W, Cox E, Goddeeris BM. Receptor-dependent immune responses in pigs after oral immunization with F4 fimbriae. *Infection and immunity* 1999 Feb;67(2):520-6.

- [7] Van den Broeck W, Bouchaut H, Cox E, Goddeeris BM. F4 receptor-independent priming of the systemic immune system of pigs by low oral doses of F4 fimbriae. *Veterinary immunology and immunopathology* 2002 Mar;85(3-4):171-8.
- [8] Snoeck V, Verfaillie T, Verdonck F, Goddeeris BM, Cox E. The jejunal Peyer's patches are the major inductive sites of the F4-specific immune response following intestinal immunisation of pigs with F4 (K88) fimbriae. *Vaccine* 2006 May 1;24(18):3812-20.
- [9] Verdonck F, Cox E, van Gog K, Van der Stede Y, Duchateau L, Deprez P, et al. Different kinetic of antibody responses following infection of newly weaned pigs with an F4 enterotoxigenic *Escherichia coli* strain or an F18 verotoxigenic *Escherichia coli* strain. *Vaccine* 2002 Jul 26;20(23-24):2995-3004.
- [10] Foss DL, Murtaugh MP. Mucosal immunogenicity and adjuvanticity of cholera toxin in swine. *Vaccine* 1999 Feb 26;17(7-8):788-801.
- [11] Lycke N. From toxin to adjuvant: the rational design of a vaccine adjuvant vector, CTA1-DD/ISCOM. *Cellular microbiology* 2004 Jan;6(1):23-32.
- [12] Lycke N, Bromander AK, Ekman L, Karlsson U, Holmgren J. Cellular basis of immunomodulation by cholera toxin in vitro with possible association to the adjuvant function in vivo. *J Immunol* 1989 Jan 1;142(1):20-7.
- [13] Murtaugh MP, Foss DL. Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Veterinary immunology and immunopathology* 2002 Sep 10;87(3-4):109-21.
- [14] Holmgren J, Adamsson J, Anjuere F, Clemens J, Czerkinsky C, Eriksson K, et al. Mucosal adjuvants and anti-infection and anti-immunopathology vaccines based on cholera toxin, cholera toxin B subunit and CpG DNA. *Immunology letters* 2005 Mar 15;97(2):181-8.
- [15] Kamstrup S, Verthelyi D, Klinman DM. Response of porcine peripheral blood mononuclear cells to CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Veterinary microbiology* 2001 Feb 26;78(4):353-62.
- [16] Verfaillie T, Cox E, Goddeeris BM. Immunostimulatory capacity of DNA vaccine vectors in porcine PBMC: a specific role for CpG-motifs? *Veterinary immunology and immunopathology* 2005 Jan 10;103(1-2):141-51.
- [17] Domeika K, Magnusson M, Eloranta ML, Fuxler L, Alm GV, Fossum C. Characteristics of oligodeoxyribonucleotides that induce interferon (IFN)-alpha in the pig and the phenotype of the IFN-alpha producing cells. *Veterinary immunology and immunopathology* 2004 Sep;101(1-2):87-102.
- [18] Van der Stede Y, Verdonck F, Verfaillie T, Goddeeris BM, Cox E. Porcine-specific CpG-oligodeoxynucleotide activates B-cells and increases the expression of MHC-II molecules on lymphocytes. *Veterinary immunology and immunopathology* 2005 May 1;105(1-2):115-24.
- [19] Van der Stede Y, Cox E, Verdonck F, Vancaeneghem S, Goddeeris BM. Reduced faecal excretion of F4+-E coli by the intramuscular immunisation of suckling piglets by the addition of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 or CpG-oligodeoxynucleotides. *Vaccine* 2003 Feb 14;21(9-10):1023-32.

- [20] Zhang L, Tian X, Zhou F. In vivo effects of oligodeoxynucleotides containing synthetic immunostimulatory motifs in weaned piglets. *International immunopharmacology* 2006 Oct;6(10):1623-31.
- [21] Jensen GM, Frydendahl K, Svendsen O, Jorgensen CB, Cirera S, Fredholm M, et al. Experimental infection with *Escherichia coli* O149:F4ac in weaned piglets. *Veterinary microbiology* 2006 Jun 15;115(1-3):243-9.
- [22] Broes A, Fairbrother JM, Lariviere S, Jacques M, Johnson WM. Virulence properties of enterotoxigenic *Escherichia coli* O8: KX105 strains isolated from diarrheic piglets. *Infection and immunity* 1988 Jan;56(1):241-6.
- [23] Levesque S, Martinez G, Fairbrother JM. Improvement of adjuvant systems to obtain a cost-effective production of high levels of specific IgY. *Poultry science* 2007 Apr;86(4):630-5.
- [24] Wenneras C, Qadri F, Bardhan PK, Sack RB, Svennerholm AM. Intestinal immune responses in patients infected with enterotoxigenic *Escherichia coli* and in vaccinees. *Infection and immunity* 1999 Dec;67(12):6234-41.
- [25] Morello CS, Ye M, Hung S, Kelley LA, Spector DH. Systemic priming-boosting immunization with a trivalent plasmid DNA and inactivated murine cytomegalovirus (MCMV) vaccine provides long-term protection against viral replication following systemic or mucosal MCMV challenge. *Journal of virology* 2005 Jan;79(1):159-75.
- [26] Dozois CM, Oswald E, Gautier N, Serthelon JP, Fairbrother JM, Oswald IP. A reverse transcription-polymerase chain reaction method to analyze porcine cytokine gene expression. *Veterinary immunology and immunopathology* 1997 Sep 19;58(3-4):287-300.
- [27] Solano-Aguilar GI, Zarlenga D, Beshah E, Vengroski K, Gasbarre L, Junker D, et al. Limited effect of recombinant porcine interleukin-12 on porcine lymphocytes due to a low level of IL-12 beta2 receptor. *Veterinary immunology and immunopathology* 2002 Oct 28;89(3-4):133-48.
- [28] Pie S, Lalles JP, Blazy F, Laffitte J, Seve B, Oswald IP. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *The Journal of nutrition* 2004 Mar;134(3):641-7.
- [29] Bensaude E, Turner JL, Wakeley PR, Sweetman DA, Pardieu C, Drew TW, et al. Classical swine fever virus induces proinflammatory cytokines and tissue factor expression and inhibits apoptosis and interferon synthesis during the establishment of long-term infection of porcine vascular endothelial cells. *The Journal of general virology* 2004 Apr;85(Pt 4):1029-37.
- [30] Verdonck F, Cox E, Van der Stede Y, Goddeeris BM. Oral immunization of piglets with recombinant F4 fimbrial adhesin FaeG monomers induces a mucosal and systemic F4-specific immune response. *Vaccine* 2004 Oct 22;22(31-32):4291-9.
- [31] Bianchi AT, Scholten JW, Moonen Leusen BH, Boersma WJ. Development of the natural response of immunoglobulin secreting cells in the pig as a function of organ, age and housing. *Developmental and comparative immunology* 1999 Sep;23(6):511-20.

- [32] Olsson E, Smyth CJ, Soderlind O, Svennerholm AM, Mollby R. Development of intestinal antibodies against *Escherichia coli* antigens in piglets with experimental neonatal *E. coli* diarrhoea. *Veterinary microbiology* 1986 Jul;12(2):119-33.
- [33] Alexa P, Hamrik J, Stouracova K, Salajka E. Oral immunization against enterotoxigenic colibacillosis in weaned piglets by non-pathogenic *Escherichia coli* strain with K88 (F4) colonizing factor. *Veterinarni medicina* 2005 Mai 18;50(7):5.
- [34] Tizard I. *Veterinary Immunology: An introduction*, 7th edition. Philadelphia: Saunders, 2004.
- [35] Brandtzaeg P, Johansen FE. Mucosal B cells: phenotypic characteristics, transcriptional regulation, and homing properties. *Immunological reviews* 2005 Aug;206:32-63.
- [36] Snoeck V, Peters IR, Cox E. The IgA system: a comparison of structure and function in different species. *Veterinary research* 2006 May-Jun;37(3):455-67.
- [37] Yi AK, Chace JH, Cowdery JS, Krieg AM. IFN-gamma promotes IL-6 and IgM secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and oligodeoxynucleotides. *J Immunol* 1996 Jan 15;156(2):558-64.
- [38] Yamamoto S, Yamamoto T, Shimada S, Kuramoto E, Yano O, Kataoka T, et al. DNA from bacteria, but not from vertebrates, induces interferons, activates natural killer cells and inhibits tumor growth. *Microbiology and immunology* 1992;36(9):983-97.
- [39] Linghua Z, Xingshan T, Fengzhen Z. In vivo immunostimulatory effects of CpG ODN in newborn piglets. *Molecular immunology* 2007 Feb;44(6):1238-44.
- [40] Guzyllack-Pirou L, Balmelli C, McCullough KC, Summerfield A. Type-A CpG oligonucleotides activate exclusively porcine natural interferon-producing cells to secrete interferon-alpha, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-12. *Immunology* 2004 May;112(1):28-37.
- [41] Vollmer J. CpG motifs to modulate innate and adaptive immune responses. *International reviews of immunology* 2006 May-Aug;25(3-4):125-34.
- [42] Linghua Z, Xingshan T, Fengzhen Z. In vivo effects of oligodeoxynucleotides containing synthetic immunostimulatory motifs in the immune response to swine streptococcal septicemia vaccine in weaned piglets. *Molecular immunology* 2007 Feb;44(6):1141-9.
- [43] Rothenfusser S, Tuma E, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Human immunology* 2002 Dec;63(12):1111-9.
- [44] Hochrein H, Wagner H. Of men, mice and pigs: looking at their plasmacytoid dendritic cells [corrected]. *Immunology* 2004 May;112(1):26-7.
- [45] Zhang L, Tian X, Zhou F. CpG oligodeoxynucleotides augment the immune responses of piglets to swine *Pasteurella multocida* living vaccine in vivo. *Research in veterinary science* 2007 Oct;83(2):171-81.
- [46] Xu W, Tamura T, Takatsu K. CpG ODN mediated prevention from ovalbumin-induced anaphylaxis in mouse through B cell pathway. *International immunopharmacology* 2008 Feb;8(2):351-61.

- [47] Calinescu C, Nadeau E, Mulhbachter J, Fairbrother JM, Mateescu MA. Carboxymethyl high amylose starch for F4 fimbriae gastro-resistant oral formulation. *International journal of pharmaceutics* 2007 Oct 1;343(1-2):18-25.
- [48] Klinman DM, Currie D, Gursel I, Verthelyi D. Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunological reviews* 2004 Jun;199:201-16.
- [49] Vajdy M, Srivastava I, Polo J, Donnelly J, O'Hagan D, Singh M. Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA-based vaccines. *Immunology and cell biology* 2004 Dec;82(6):617-27.
- [50] Verdonck F, Snoeck V, Goddeeris BM, Cox E. Cholera toxin improves the F4(K88)-specific immune response following oral immunization of pigs with recombinant FaeG. *Veterinary immunology and immunopathology* 2005 Jan 10;103(1-2):21-9.
- [51] Verdonck F, De Hauwere V, Bouckaert J, Goddeeris BM, Cox E. Fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* function as a mucosal carrier for a coupled heterologous antigen. *J Control Release* 2005 May 18;104(2):243-58.
- [52] Brandtzaeg P. Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vaccine* 2007 Jul 26;25(30):5467-84.
- [53] Brandtzaeg P. Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? *Annals of the New York Academy of Sciences* 2007 Mar;1098:288-311.
- [54] Lycke NY. Cholera toxin promotes B cell isotype switching by two different mechanisms. cAMP induction augments germ-line Ig H-chain RNA transcripts whereas membrane ganglioside GM1-receptor binding enhances later events in differentiation. *J Immunol* 1993 Jun 1;150(11):4810-21.
- [55] Akhiani AA, Schon K, Lycke N. Vaccine-induced immunity against *Helicobacter pylori* infection is impaired in IL-18-deficient mice. *J Immunol* 2004 Sep 1;173(5):3348-56.
- [56] Foss DL, Zilliox MJ, Murtaugh MP. Differential regulation of macrophage interleukin-1 (IL-1), IL-12, and CD80-CD86 by two bacterial toxins. *Infection and immunity* 1999 Oct;67(10):5275-81.

Table 1. Summary of cytokine mRNA expression in different intestinal tissues for the F4-CpG and F4-CT groups

| Cytokine type | | Upregulation of cytokine expression in different intestinal sites of pigs of group ^a : | | | |
|---------------|---------------|---|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | | F4-CpG | | F4-CT | |
| | | PP-negative ^b | PP-positive ^c | PP-negative ^b | PP-positive ^c |
| Th1 | IFN- γ | p=0.005 ^d | p=0.001 | p=0.02 | p=0.004 |
| | IL12p40 | p=0.03 | - | - | - |
| | TNF- α | p=0.01 | - | - | - |
| | IL-1 β | - | P=0.03 | - | - |
| | IFN- α | - | - | p=0.02 | - |
| | IL-18 | - | - | p=0.01 | - |
| Th2 | IL-4 | p=0.001 | p=0.007 | - | - |
| | IL-6 | p=0.04 | - | - | - |

^a Pigs were immunized with F4 fimbriae and CpG or CT adjuvant.

^b PP-negative refers to intestinal tissues lacking Peyer's patches,

^c PP-positive refers to intestinal tissues containing Peyer's patches.

^d Significant ($P = 0.05$ or less) up-regulation of expression of cytokine gene compared to F4 group; (-): indicate no significant differences in expression of cytokine genes when compared to F4 group.

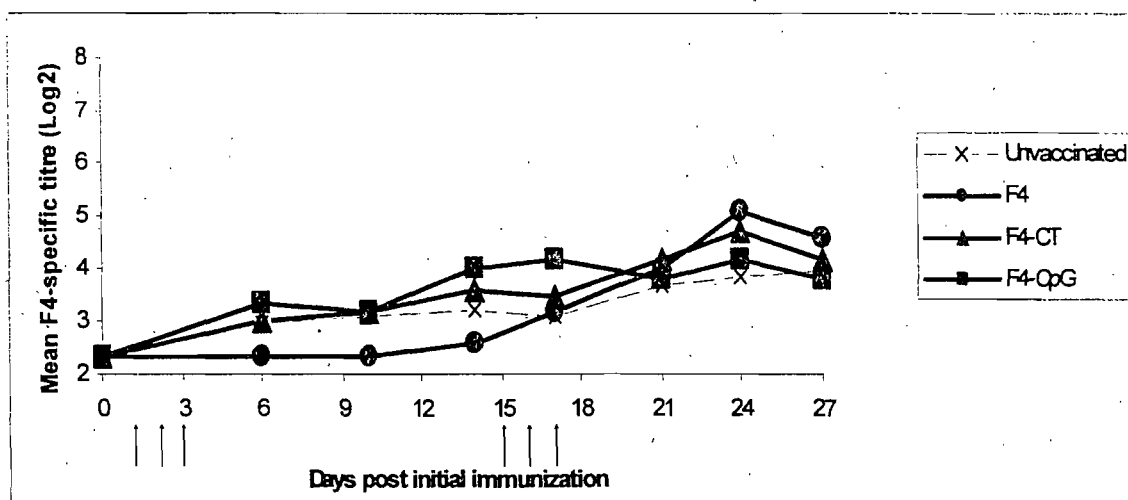


Fig. 1. No significant difference in mean F4-specific IgM serum antibody titers was observed between the F4, F4-CpG, F4-CT, and unvaccinated groups. Arrows indicate consecutive days of homologous oral immunisation procedure (see materials and methods). Day 1: initial immunisation, Day 26: Necropsy.

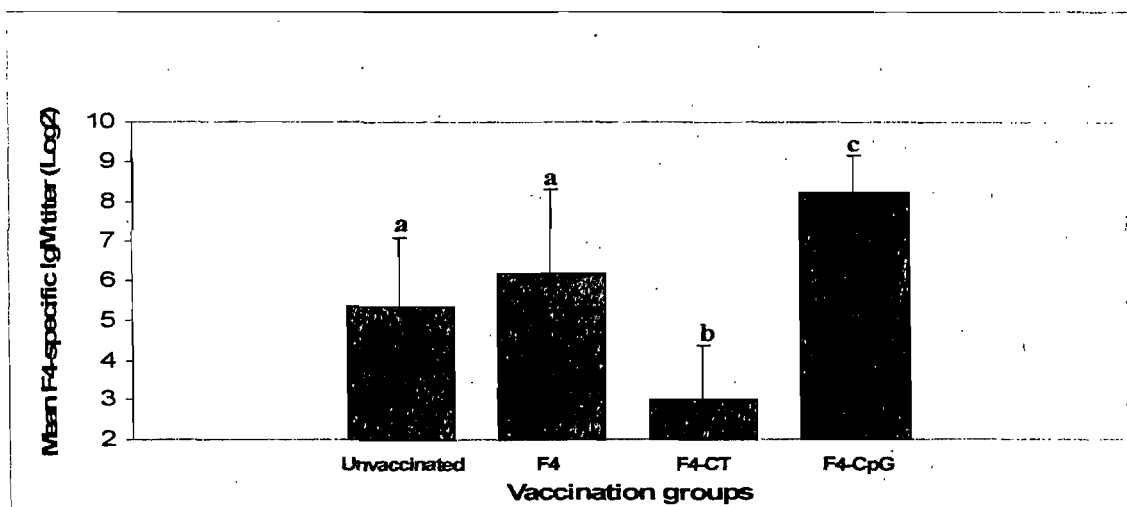


Fig. 2. A significant increase in the level of anti-F4 IgM was observed in the small intestinal contents of pigs of the F4-CpG group at 26 days after initial immunisation, whereas a significant decrease in the level of anti-F4 IgM was observed in the small intestinal contents of the F4-CT group, as compared to pigs of the F4 group. No significant increase in the level of anti-F4 IgM was observed in the small intestinal contents of pigs of the F4 group as compared to the unvaccinated group. Letters a, b and c represent significantly different ($P = 0.05$ or less) groups. Vertical lines indicate standard deviation.

Discussion

Le développement des vaccins sous-unitaires oraux connaît aujourd'hui un nouvel essor, principalement à cause d'une meilleure compréhension de l'immunologie fondamentale de l'hôte lors de l'infection d'un pathogène, et par l'application de ces connaissances dans l'élaboration d'une formulation vaccinale, notamment par l'ajout d'adjuvant immuno-stimulateur. Cette stratégie préventive dans le cas d'infections intestinales liée aux ETEC F4+ chez le porc causant la DPS, semble très prometteuse spécialement en ce qui concerne l'utilisation du fimbriae F4 supplémenté d'adjuvant. Nos résultats ont démontré pour la première fois un effet d'adjuvant des CpG lorsqu'ils sont administrés oralement avec du fimbriae F4 dans un système de livraison (CM-HAS). L'utilisation des CpG a permis d'observer l'effet d'une augmentation significative de la réponse humorale spécifique-F4, plus particulièrement les Ac IgM et IgG, dans les contenus intestinaux de porcs. Ce projet avait pour objectif d'évaluer la capacité d'un vaccin oral sous-unitaire composé de fimbriae F4 additionné d'adjuvant incorporé dans un système de livraison de CM-HAS à augmenter la réponse humorale contre le fimbriae F4, tout en caractérisant l'effet immunomodulateur des adjuvants, soit un CpG (D19) et la toxine choléra native.

Nos résultats *in vivo* sur la prédominance des anticorps IgM dans les contenus intestinaux corroborent d'autres études comparables d'immunisation orale avec du fimbriae F4 (Snoeck *et al.*, 2006; Verdonck *et al.*, 2004b). La production d'Ac IgM observée dans notre étude est en accord avec ce qui est rapporté dans la littérature sur la prédominance de cet isotype au

niveau intestinal chez les jeunes porcs nouvellement sevrés suite à l'immunisation orale du fimbriae F4, mais aussi lors d'infection aux ETEC F4+ (Bianchi *et al.*, 1999; Olsson *et al.*, 1986). De plus, un effet immunostimulateur a été observé lors d'expérience *in vitro* utilisant le même CpG (D19), via l'induction de la prolifération des cellules B positives pour les Ac IgM et l'augmentation de l'expression du CMH II (Van der Stede *et al.*, 2005). Une réponse immunitaire forte composée d'Ac IgM, telle qu'observé dans l'étude de Snoeck *et al.* (2006), où des cellules sécrétrices d'IgM ont été observées dans les PP du jéjunum et de l'iléon 14 jours après l'immunisation intestinale avec du fimbriae F4, pourrait être un des mécanismes efficaces de résistance contre la DPS associée au ETEC F4+ chez les animaux susceptibles. Cette réponse rapide pourrait être particulièrement importante quand on sait que la période de susceptibilité des animaux à la DPS se situe tôt lors de la période post-sevrage (Alexa *et al.*, 2005) et que la colonisation bactérienne de l'intestin est très rapide (Verdonck *et al.*, 2002).

L'observation de la présence d'Ac IgG dans les contenus intestinaux est corroborée par une étude démontrant la présence de cellules sécrétrices d'anticorps IgG dans les tissus lymphoïdes intestinaux après l'administration orale et lors d'exposition du jéjunum aux fimbriae F4 (Snoeck *et al.*, 2006). L'absence de production d'Ac IgA au moment de la récolte des échantillons à 26 jours post-immunisation initiale, soit des animaux âgés de 60 jours, indique possiblement une production tardive d'IgA spécifique à F4. Verdonck *et al.* (2002) ont noté que l'induction et le changement d'isotype de l'IgM vers l'IgA étaient plus

lents après l'immunisation orale avec du fimbriae F4 purifiés que lors d'une infection aux ETEC F4+ (Verdonck *et al.*, 2002, 2004b). De façon similaire, peu de cellules sécrétrices d'IgA spécifiques anti-F4 ont été retrouvées dans le jéjunum et l'iléon 21 jours après l'immunisation orale de fimbriae F4 à des porcs âgés de 53-56 jours, comparativement aux hauts niveaux d'Ac IgM observés au même moment (Snoeck *et al.*, 2006).

Le protocole d'immunisation des porcs a été optimisé au cours des essais *in vivo* de manière à prévenir les infections aux ETEC F4+ pathogènes pouvant provenir de la ferme. Un total de 3 essais *in vivo* a été accompli, dont les deux premiers ont permis d'obtenir des résultats préliminaire sur la production d'Ac sériques et mucosaux anti-F4 produits par les animaux (Annexe 1). Après analyse des résultats, nous avons constaté que ceux-ci représentaient la réponse immunitaire d'une infection aux bactéries ETEC F4+. Pour palier à ce problème, l'application de condition expérimentale plus stricte visant à éviter l'entrée de bactérie ETEC F4+ dans les unités d'immunisation via des animaux porteurs a été mis en place. Pour ce faire, de la colistine a été administrée oralement pendant 5 jours consécutifs afin d'éliminer les *E. coli* pathogènes dans leurs intestins. De plus, les pattes des animaux ont été brossées et nettoyées, et les locaux désinfectés pendant la période d'administration de colistine afin d'éliminer les ETEC F4+ potentiellement excrétés dans les fèces. Ceci a permis d'effectuer une 3^e expérience *in vivo* sans détection des gènes codant pour le fimbriae F4 et les toxines STa, STb et LT par PCR dans les fèces, nous assurant que les porcs n'étaient pas porteurs de ces souches de bactéries ETEC lors de l'essai.

La préparation du vaccin sous-unitaire composée de fimbriae F4 semi purifiés a aussi été optimisée afin d'éliminer les bactéries vivantes de la souche d'*E. coli* utilisée pour la purification des fimbriae F4. L'irradiation des fimbriae F4 lyophilisées a été utilisée, car cette méthode est une des façons les plus efficaces pour la stérilisation de matière lyophilisées (Morehouse, 1998). Trois quantités de *E. coli* F4+ (10^3 , 10^5 et 10^7) lyophilisés dans du PBS ont été exposées à trois doses d'irradiation (5, 10 et 15 Kgray). Les résultats ont démontré que l'exposition du lyophilisat à la plus faible dose (5 Kgray) était suffisante pour stériliser l'échantillon contenant la plus grande quantité de bactérie (10^7) et pouvait donc liser le lyophilisat de fimbriae F4. L'irradiation a été accomplie avant l'incorporation de l'adjuvant, pour ne pas dénaturer ce dernier. Nous avons démontré que les fimbriae n'étaient pas dénaturés ou altérés, et pouvaient encore se lier à leurs récepteurs spécifiques suivant l'irradiation à 5 Kgray. Ceci a été vérifié par dosage des protéines, SDS-PAGE, immunofluorescence anti-F4 ainsi que par western blot (Annexe 2)

Une autre nouveauté introduite au cours des expérimentations est l'utilisation du PCR-RFLP permettant de discriminer les porcelets possédant le récepteur F4 (Jensen *et al.*, 2006) et ce avant le sevrage. Avant la mise au point de cette technique, la sélection des animaux s'effectuait *post-mortem* par immunofluorescence anti-F4 (Broes *et al.*, 1988), par l'utilisation de F4 marqués au FITC ou plus fréquemment par un test d'adhésion du F4 aux vésicules de bordures en brosse des animaux (Van den Broeck *et al.*, 1999a). L'utilisation de la technique de PCR-RFLP a donc permis de sélectionner les animaux ayant le récepteur

F4 et d'économiser du temps lors des manipulations *in vivo* et de laboratoire, ainsi que de réduire le nombre d'animaux utilisés dans les essais.

L'absence d'Ac spécifiques aux fimbriae F4 dans le sérum de nos animaux est contraire aux résultats observés dans les autres expériences menées sur l'immunisation à l'aide du fimbriae F4 et pourrait être attribuable aux différents modes d'administration. En effet, dans la plupart des autres expériences, l'antigène a été administré sous forme liquide (Van den Broeck *et al.*, 1999a, 1999b et 2002), tandis que nous avons utilisée un système de livraison (CM-HAS) sous forme de comprimé. Cette différente méthodologie aurait possiblement comme impact une plus grande exposition des muqueuses pré-intestinales à l'immunogène F4 (sous forme liquide) et conséquemment une réponse systémique du système immunitaire (i.e. par contact a travers de petites lésions dans les gencives) (Snoeck *et al.*, 2006). Cette hypothèse est en regard avec la compartimentation existant entre le système immunitaire périphérique et local, tel que discuté par Snoeck *et al.* (2006).

Nos résultats ont permis de confirmer la capacité du CpG-A (D19) à stimuler le système inné et adaptatif du système immunitaire intestinal porcin lors d'administration orale. Fait intéressant, Rothenfusser *et al.* (2002), décrivaient un modèle comportant un système d'activation immunitaire de type Th1 et Th2 associés aux CpG de type A chez l'humain. Le modèle est basé sur la capacité des cellules dendritiques plasmacytoides à générer deux cytokines majeures de type Th1, soit l'IFN- α associée à une voie directe impliquant les

macrophages, cellules NK et cellules dendritiques myéloïdes, et une voie indirecte de type Th2 impliquant l'IL-12 (Guzylack-Piriou *et al.*, 2004). La production plus tardive de l'IL-12 et du TNF- α en présence d'un stimulus exogène bactérien jouerait un rôle important dans l'activation des cellules T dépendant de l'Ag, et sur la prolifération des cellules B, ce qui mènerait à la production d'IL-6 et d'anticorps. Klinman (2004) décrivait un modèle similaire sur les mécanismes de CpG stimulant la réponse innée et adaptative, ce qui vient renforcer l'idée que pour avoir une forte réponse humorale, celle-ci doit être précédé d'une forte réponse immunitaire de type 1 (Klinman, 2004). L'ajout d'adjuvant à la formulation vaccinale a eu un effet sur la réponse humorale, mais aussi sur la réponse cytokinaire associée. L'augmentation des cytokines IFN- γ et IL-6 de nos résultats correspond à ce qui a été rapporté dans la littérature lors d'exposition de lymphocyte B murins au CpG et à l'IFN- γ , où il y a induction subséquente d'IL-6 et production d'Ac IgM (Yi *et al.*, 1996). De plus, nos résultats pourraient expliquer des résultats obtenus par d'autres études *in vitro* avec le CpG-A (D19), notamment la stimulation de cellules B porcines (Van der Stede *et al.*, 2005; Linghua *et al.*, 2007), ainsi que la production des cytokines IL-6, IL-12, TNF- α (Kamstrup *et al.*, 2001) et INF- γ (Verfaillie *et al.*, 2005) par des PBMC porcins. Seulement nos résultats concernant l'augmentation de la production d'IL-4, est contraire à ce qui a été rapporté dans la littérature (Zhang *et al.*, 2006). Cette différence peut-être due aux sites intestinaux examinés, aux voies d'administration utilisée ou encore aux procédures expérimentales (i.e. *in vitro* vs *in vivo*).

La mise en perspective de nos résultats chez le porc et l'information disponible dans la littérature chez l'humain et le porc suggèrent qu'il y a une correspondance entre les résultats obtenus *in vitro* chez l'humain et ceux obtenus *in vivo* et *in vitro* chez le porc. Ceci renforçant le concept d'utilisation du porc comme modèle pré-clinique remplaçant l'humain en ce qui a trait à l'intestin (Hochrein *et Wagner*, 2004; Guzylack-Piriou *et al.*, 2004).

Un aspect surprenant de nos résultats est l'absence de réponse humorale anti-F4 après l'administration orale de CT avec les fimbriae F4. La toxine choléra est reconnue comme un puissant adjuvant mucosal, améliorant la réponse humorale anti-F4 caractérisé par une production accrue d'Ac IgA salivaires lors d'immunisation orale chez le porc avec l'adhésine majeur du fimbriae F4 (FaeG recombinant) (Verdonck *et al.*, 2005a) ou avec le fimbriae F4 couplé à l'albumine sérique humaine (Verdonck *et al.*, 2005b). Cependant, l'inefficacité de CT à induire une réponse humorale lors d'immunisation orale a déjà été rapportée dans d'autres études (Foss *et Murtaugh*, 1999; Alcon *et al.*, 2005; Drago-Serrano *et al.*, 2004). En effet, Foss et Murtaugh (1999) observaient que l'effet d'adjuvant de CT pour les protéines hétérologues administrées par voie orale était variable, puisque aucune induction d'Ac n'avait été observée contre le KLH (Keyhole Limpet Hemocyanin) lors de co-administration avec CT.

Parmi les hypothèses envisagées, il est possible que ces résultats soient dus à la précocité de la réponse immunitaire anti-F4, généralement composées d'Ac IgM, tandis que l'effet de CT

serait associé à une plus grande production d'Ac IgA mucosaux (Lycke *et al.*, 1989). La différence des résultats peut aussi être expliquée en partie par l'utilisation du système de livraison CM-HAS, qui pourrait avoir réduit l'exposition du F4 aux muqueuses pré-intestinales (i.e. NALT) puisque les vaccins sous-unitaires oraux n'induisent pas une forte réponse en Ac sériques (Snoeck *et al.*, 2006; Brandtzaeg, 2007a). De plus, puisque nous avons recherché les Ac IgA dans les contenus intestinaux, et que les deux études mentionnées précédemment détectaient ces Ac dans la salive, il est possible que ces Ac salivaires ne reflètent pas la réponse produite au niveau intestinal tel que rapporté dans la littérature (Brandtzaeg, 2007b). Une autre explication possible serait associée au ratio Ag / CT utilisé pour la préparation vaccinale. Ce ratio serait important pour l'efficacité de CT comme adjuvant puisque l'effet de CT est dépendant de la quantité d'Ag (Murtaugh *et Foss*, 2002). Dans le même ordre d'idée, nos doses de fimbriae F4 utilisées, soit 500 µg étaient beaucoup plus faibles que celles utilisées par Verdonck *et al.* (2005a) pour la même dose de CT.

Malgré l'absence d'une production d'Ac spécifiques aux fimbriae F4, nous avons observé que la présence de CT a quand même eu un impact sur la production de cytokine de type Th1, dont IFN- γ , IL-18 et IFN- α , suggérant qu'il n'y a pas eu induction de tolérance orale aux fimbriae F4 chez les animaux. Théoriquement, l'IL-1, l'IL-12 et l'IFN- γ seraient impliqués dans l'action adjuvant de CT chez le porc (Murtaugh *et Foss*, 2002). La présence de ces cytokines considérées comme des cytokines clés du système inné, créerait un

environnement de type pro-inflammatoire, augmentant ainsi l'échantillonnage des Ag par les cellules présentatrices d'Ag. L'IL-12 aiderait à rediriger cette réponse de type Th1 vers le type Th2. L'absence de surexpression des gènes de ces cytokines dans les tissus intestinaux regardés dans notre étude pourrait expliquer en partie l'absence d'Ac dans les sécrétions intestinales.

Plusieurs études ont été des échecs à prévenir la DPS de façon significative lors d'essais *in vivo* avec infection chez le porc. L'absence d'utilisation d'un système de livraison conférant une protection contre la dégradation des fimbriae en milieu acide (gastrique) pourrait avoir contribué aux résultats mitigés obtenus dans ces expériences. Dans notre cas, l'utilisation du système de livraison CarboxyMethyl High Amylose Starch (CM-HAS), aura probablement permis d'éviter cette dégradation des agents immunogènes en milieu acide, ainsi que de contrôler le largage de ces mêmes agents actifs dans une fenêtre d'action propice (Calinescu *et al.*, 2007). Le système de livraison aura peut-être contribué à augmenter l'efficacité du vaccin, tout en diminuant le coût de sa production, puisque de plus petites doses auront pu être administrées. En plus, le CM-HAS procurerait probablement l'avantages d'avoir une proximité entre l'Ag et l'adjuvant dans le site d'activité (Klinman 2004; Vajdy *et al.*, 2004).

Un avantage économique qui ressort de l'étude, est l'efficacité des CpG comme adjuvant par rapport au coût du produit et à sa disponibilité. Contrairement à CT qui est coûteuse et

requiert d'entreprendre des formalités administratives dues à la vente restreinte de ce produit. De plus, l'optimisation des doses de CpG et de F4 pour obtenir une réponse humorale optimale pourrait contribuer à augmenter la rentabilité commerciale du vaccin, spécialement avec l'utilisation du système de livraison CM-HAS. L'administration de la formulation vaccinale dans ce système de livraison a permis de conférer une protection, une proximité entre Ag et adjuvant, ainsi que diminuer la quantité de F4 administrés tout en retenant une activité immunologique significative.

En perspective, des études plus approfondies sur les quantités utilisées (ratio) de l'adjuvant CpG et du fimbriae F4 administrés oralement chez le porc permettraient de voir s'il est possible d'augmenter la réponse humorale obtenue. Une autre optimisation possible de la formulation vaccinale serait de lier physiquement l'Ag au CpG à l'aide d'un agent de liaison (linker). La liaison de CpG à de l'ovalbumine a permis de diminuer de dix fois la quantité d'Ag utilisé tout en obtenant la même réponse immunitaire contre l'Ag administré, comparativement aux CpG non-liées à l'ovalbumine (Maurer *et al.*, 2002). En ce qui a trait aux répercussions de l'immunisation sur le système immunitaire, et plus particulièrement sur les cytokines produites, il serait intéressant de pouvoir faire des nécropsies sur les animaux quelques jours après la 1^{er} et la 2^e immunisation, afin d'évaluer la cinétique des réponses humorales et cytokinaires. De plus, les résultats obtenus par la détection semi-quantitative par RT-PCR des cytokines pourraient être optimisés en utilisant du PCR en temps réel pour la détection des cytokines porcines. Finalement, le plus important serait de

vérifier si ces stimulations humorales et cytokinaires obtenues sont efficaces à prévenir la DPS, en testant la formulation vaccinale à l'aide d'un modèle *in vivo* porcin d'infection aux ETEC F4+ pathogènes.

Conclusion

Nos études portant sur l'utilisation de CpG-ODN comme adjuvant lors d'immunisation orale chez le porc auront permis d'observer une augmentation de la production d'Ac anti-F4 au niveau des muqueuses intestinales. De plus, l'utilisation de CpG-ODN aura aidé à élucider davantage les mécanismes de son action sur le système immunitaire de l'hôte par le biais des cytokines regardées dans cette étude, un aspect important pour l'élaboration de nouvelle formulation vaccinale mucosale.

Les expériences réalisées ont permis de mettre au point plusieurs aspects de notre modèle d'immunisation. L'utilisation d'une technique de PCR-RFLP, aura permis de discriminer entre les animaux possédant ou non le récepteur spécifique pour F4. Un aspect qui était relativement contraignant et coûteux avec les anciennes méthodes de détection post-mortem. Le modèle a été optimisé par l'application de procédures de biosécurité strictes permettant l'élimination des souches d'*E. coli* pathogènes, dont les ETEC F4+, provenant de la ferme. Finalement, la préparation vaccinale des fimbriae F4 pour utilisation dans un vaccin a aussi été optimisée. Notamment, par l'utilisation de l'irradiation pour stériliser la préparation de l'Ag F4 pour éliminer les bactéries vivantes F4+ résiduelles, après la purification du fimbriae F4.

Enfin, l'utilisation *in vivo* du système de livraison d'un vaccin oral à base de CM-HAS aura permis de corroborer les résultats obtenus *in vitro* en ce qui à trait à la capacité du système à protéger et larguer les différents vaccins composées de fimbriae F4 avec ou sans adjuvant. Ceci démontrant encore une fois des liens entre la recherche *in vivo* et *in vitro*. Cette protection accrue aura permis la réduction de la quantité de F4 à utiliser, réduisant ainsi les coûts de production tout en augmentant potentiellement l'efficacité de l'adjuvant à promouvoir une réponse humorale contre l'antigène co-administré. En résumé, l'utilisation des CpG-ODN comme immuno-stimulateur, semble être un atout important pour hausser et soutenir la réponse immunitaire de l'hôte contre les vaccins oraux sous-unitaires.

Bibliographie

Alcon, V., Baca-Estrada, M., Vega-Lopez, M., Willson, P., Babiuk, L.A., Kumar, P., et al. (2005) Mucosal delivery of bacterial antigens and CpG oligonucleotides formulated in biphasic lipid vesicles in pigs. *The AAPS journal*. 7:E566-71

Alexa, P., Hamrik, J., Stouracova, K., and Salajka, E. (2005) Oral immunisation against enterotoxigenic colibacillosis in weaned piglets by non-pathogenic *Escherichia coli* strain with K88 (F4) colonizing factor. *Veterinarni medicina*, 50:315-320

Bailey, M., Hall, L., Bland, P.W. and Stokes, C.R. (1994) Production of cytokines by lymphocytes from spleen, mesenteric lymph node and intestinal lamina propria of pigs. *Immunology*, 82:577-83

Bailey, M., Plunkett, F.J., Rothkotter, H.J., Vega-Lopez, M.A., Haverson, K. and Stokes C.R. (2001) Regulation of mucosal immune responses in effector sites. *Proc. Nutri. Soc.* 60: 427-435

Bianchi, A.T.J., Scholten, J.W., van Zijderveld, A.M., van Zijderveld, F.G. and Bokhout, B.A. (1996) Parenteral vaccination of mice and piglets with F4+ *Escherichia coli* suppresses the enteric anti-F4 response upon oral infection. *Vacc.* 14:199-206

Bianchi, A.T.J., Scholten, J.W., Moonen Leusen, B.H.W.M. and Boersma W.J.A. (1999) Development of the natural response of immunoglobulin secreting cells in the pig as a function of organ, age and housing. *Develop. Comp. Immuno.* **23**: 511-520

Blanco, M., Schumacher, S., Tasara, T., Zweifel, C., Blanco, J.E., Dahbi, G., et al. (2005) Serotypes, intimin variants and other virulence factors of eae positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (eae-eta2). *BMC Microbiol.* **5**:23

Brandtzaeg, P. (2007a) Induction of secretory immunity and memory at mucosal surfaces. *Vacc.* **25**:5467-84

Brandtzaeg, P. (2007b) Do salivary antibodies reliably reflect both mucosal and systemic immunity? *Ann. NY Acad. Sci.* **1098**:288-311

Broes, A., Fairbrother, J.M., Lariviere, S., Jacques, M., Johnson, W.M. (1988) Virulence properties of enterotoxigenic *Escherichia coli* O8: KX105 strains isolated from diarrheic piglets. *Infect. Immun.* **56**:241-6

Butler, J.E., Weber, P., Sinkora, M., Baker, D., Schoenherr, A., Mayer, B., and Francis, D. (2002) Antibody repertoire development in fetal and neonatal piglets. VIII. Colonisation is required for newborn piglets to make serum antibodies to T-dependent and type 2 T-independent antigens. *J. Immunol.* **169**: 6822-6830

Calinescu, C., Mulhbachter, J., Nadeau, E., Fairbrother, J.M. and Mateescu, M.A. (2005) Carboxymethyl high amylase starch (CM-HAS) as excipient for *Escherichia coli* oral formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **60**:53-60

Calinescu, C., Nadeau, E., Mulhbachter, J., Fairbrother, J.M. and Mateescu, M.A. (2007) Carboxymethyl high amylose starch for F4 fimbriae gastro-resistant oral formulation. *Int. J. Pharm.* **343**:18-25

Cox, E., Van der Stede, Y., Verdonck, F., Snoeck, V., Van den Broeck, W. and Goddeeris, B. (2002) Oral immunisation of pigs with fimbrial antigens of enterotoxigenic *E. coli* : an interesting model to study mucosal immune mechanisms. *Vet. Immunol. Immunopath.* **87**:287-290

Crawley, A., Raymond, C. and Wilkie, B.N. (2003) Control of immunoglobulin isotype production by porcine B-cells cultured with cytokines. *Vet. Immunol. Immunopath.* **91**:141-

Dalpke, A.H. and Heeg, K. (2004) CpG-DNA as immune response modifier. *Int. J. Med. Microbiol.* 294:345-354

Danabassis, M.S. (2006). The importance of the F4 receptor in post-weaned pigs in eliciting F4 specific immune response in the intestine. Faculty dept. of veterinary microbiology, Faculty of veterinary medicine, Saskatoon, University of Saskatchewan: 114 p.

Drago-Serrano, M.E., Manjarrez Hernandez, H.A., Gavilanes Parra, S., Sainz Espunes, T. del R. (2004) Antibody response in mice immunized by mucosal routes with formalin-inactivated enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strains. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 46:17-23

Fairbrother, J.M., Nadeau, É. and Gyles, C.L. (2005) *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim. Health Res. Rev.* 6:17-39

Felder, Ch.B., Vorlaender, N., Gander, B., Merkle, H.P. and Bertschinger, H.U. (2001) Microencapsulated enterotoxigenic *Escherichia coli* and detached fimbriae for peroral vaccination of pigs. *Vacc.* 19:706-715

Foss, D.L., and Murtaugh, M.P. (1999) Mucosal immunogenicity and adjuvanticity of cholera toxin in swine. *Vacc.* 17:788-801

Freytag, L.C. and Clements, J.D. (2005) Mucosal adjuvants. *Vacc.* 23:1804-1813

Frydendahl, K. (2002) Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet. Microbiol.* 85:169-182

Guzylack-Piriou, L., Balmelli, C., McCullough, K.C. and Summerfield, A. (2004) Type-A CpG oligonucleotides activate exclusively porcine natural interferon-producing cells to secrete interferon-alpha, tumour necrosis factor-alpha and interleukin-12. *Immunology*, 112:28-37

Gyles, C.L. and Fairbrother, J.M. (2004) *Escherichia coli*, Chapter 16. In *Pathogenesis of bacterial infections in animals*, 3 ed., pp.456. Edited by C.L. Gyles, J.G. Songer and C.O. Thoen. Blackwell Publishing.

Haesebrook, F., Pasmans, F., Chiers, K., Maes, D., Ducatelle, R., and Decostere, A. (2004) Efficacy of vaccines against bacterial diseases in swine: what can we expect? *Vet. Microbiol.* 100: 255-268

Haverson, K., Singha, S., Stokes, C.R. and Bailey, M. (2000) Professional and non-professional antigen-presenting cells in the porcine small intestine. *Immunology*, **101**: 492-500

Hochrein, H. and Wagner, H. (2004) Of men, mice and pigs: looking at their plasmacytoid dendritic cells. *Immunology*, **112**:26-7

Holmgren, J. and Czerkinsky, C. (2005) Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.* **11**: 45-53

Huyghebaert, N. (2004) Development of an oral formulation of viable recombinant *Lactococcus lactis* and F4 fimbriae. Faculty dept. of pharmaceutical sciences, Faculty of pharmaceutical sciences, Ghent, Ghent University: 197 p.

Huyghebaert, N., Snoeck, V., Vermeire, A., Cox, E., Goddeeris, B.M. and Remon J.P. (2005) Development of an enteric-coated pellet formulation of F4 fimbriae for oral vaccination of suckling piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **59** :273- 281

Ioannou, X.P., Griebel, P., Mena, A., Gomis, S.M., Godson, D.L., Mutwiri, G., Hecker, R., Babiuk, L.A. and Van Drunen Little-Van Den Hurk, S. (2003) Safety of CpG oligodeoxynucleotides in veterinary species. *Antisense Nucleic A.* **13**: 157-167

Jensen, G.M., Frydendahl, K., Svendsen, O., Jorgensen, C.B., Cirera, S., Fredholm, M., et al. (2006) Experimental infection with *Escherichia coli* O149:F4ac in weaned piglets. *Vet. Microbiol.* **115**:243-9

Jin, L.Z. and Zhao, X. (2000) Intestinal receptors for adhesive fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88 in swine – a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **54**: 311-318

Kamstrup, S., Verthelyi, D. and Klinman, D.M. (2001) Response of porcine peripheral blood mononuclear cells to CpG-containing oligodeoxynucleotides. *Vet. Microbiol.* **26**;78:353-62

Kelsall, B.L. and Rescigno, M. (2004) Mucosal dendritic cells in immunity and inflammation. *Nat. Immunol.* **11**:1091-1095

Klinman, D.M., Currie, D., Gursel, I. and Verthelyi, D. (2004) Use of CpG oligodeoxynucleotides as immune adjuvants. *Immunol. Rev.* **199**:201-216

Kraehenbuhl, J.P. and Neutra M.R. (2000) Epithelial M cells: Differentiation and function. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **16**:301-332

Krieg, A.M. (2002) CpG motifs in bacterial DANN and their immune effects. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:709-760

Levine, M.M. (1987) *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. D.* **155**:377-89.

Li, G.F., Zhu, H.F., Shao, G.Q., Zhu, J.Z., Ma, Y.Q., and Zhang, Z.S. (2004) Heterogeneity in the response of pigs and mice to specific CpG oligodeoxynucleotide. *Chinese journal of agricultural biotechnology*, **1**:109-114

Linghua Z, Xingshan T and Fengzhen Z. (2007) *In vivo* immunostimulatory effects of CpG ODN in newborn piglets. *Mol. Immunol.* **44**:1238-44.

Linghua, Z., Xingshan, T. and Fengzhen, Z. (2008) *In vivo* oral administration effects of various oligodeoxynucleotides containing synthetic immunostimulatory motifs in the immune response to pseudorabies attenuated virus vaccine in newborn piglets. *Vacc.* **26**:224-33.

Lycke, N. and Holmgren, J. (1986) Strong adjuvant properties of cholera toxin on gut mucosal immune responses to orally presented antigens. *Immunology*, **59**:301-8.

Lycke, N., Bromander, A.K., Ekman, L., Karlsson, U. and Holmgren, J. (1989) Cellular basis of immunomodulation by cholera toxin *in vitro* with possible association to the adjuvant function *in vivo*. *J. Immunol.* **142**:20-7.

Lycke, N. (2004) From toxin to adjuvant: the rational design of a vaccine adjuvant vector, CTA1-DD/ISCOM. *Cell. Microbiol.* **6**:23-32.

MacDonald, T., T. and Monteleone, G. (2005) Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* **307**:1920-1925.

Madec, F., Bridoux, N., Bounaix, S., Cariolet, R., Duval-Iflah, Y., Hampson, D.J. and Jestin, A. (2000) Experimental models of porcine post-weaning colibacillosis and their relationship to post-weaning diarrhoea and digestive disorders as encountered in the field. *Vet. Microbiol.* **72**:295-310.

Maurer, T., Heit, A., Hochrein, H., Ampenberger, F., O'keeffe, M., Bauer, S., Lipford, G.B., Vabulas, R.M. and Wagner, H. (2002) CpG-DANN aided cross-presentation of soluble antigens by dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **32**:2356-2364.

Mei, J. and Xu, R-J. (2005) Transient changes of transforming growth factor-B expression in the small intestine of the pig in association with weaning. *Brit. J. Nutri.* **93**:37-45

Melin, L., Matisson, S., Katouli, M. and Wallgren, P. (2004) Development of post weaning diarrhoea in piglets. Relation to presence of *Escherichia coli* strains and rotavirus. *J. Vet. Med. B.* **51**:12-22

Moon, H.W. and Bunn, T.O. (1993) Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. *Vacc.* **11**:213-220

Morehouse, K.M. (1998) Food irradiation: The treatment of foods with ionizing radiation. USDA, *Food testing and analysis* **4**:9-35 www.cfsan.fda.gov/~dms/opa-fdir.html

Mulhbacher, J., Ispas-Szabo, P. and Mateescu, M.A. (2004) Cross-linked high amylose starch derivatives for drug release II. Swelling properties and mechanistic study. *Int. J. Pharm.* **278**:231-238

Mulhbacher, J. and Mateescu, M.A. (2005) Cross-linked high amylose starch derivatives for drug release III. Diffusion properties. *Int. J. Pharm.* **297**:22-29

Murtaugh, M.P. and Foss, D.L. (2002) Inflammatory cytokines and antigen presenting cell activation. *Vet. Immunol. Immunopath.* **87**:109-21

Nataro, J.P. and Kaper, J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:142-201

Ogra, P.L., Faden H., Welliver, R.C. (2001) Vaccination strategies for mucosal immune responses. *Clin Microbiol Rev* **14**:430-45

O'Hagan, D.T. and Valiante, N.M. (2003) Recent advances in the discovery and delivery of vaccine adjuvants. *Nat. Rev.* **2**:727-735

Olsson, E., Smyth, C.J., Soderlind, O., Svennerholm, A.M. and Mollby, R. (1986) Development of intestinal antibodies against *Escherichia coli* antigens in piglets with experimental neonatal *E. coli* diarrhoea. *Vet. Microbiol.* **12**:119-133

Orskov, I., Orskov, F., Sojka, W.J. and Leach, J.M. (1961) Simultaneous occurrence of *E. coli* B and Lantigens in strains from diseased swine. Influence of cultivation temperature. Two new *E. coli* Kantigens: K 87 and K 88. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **53**:404-22

Orskov, F., and Orskov, I., (1992) *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can. J. Microbiol.* **38**: 699-704

Pabst, R. and Rothkotter, H.J. (1999) Postnatal development of lymphocyte subsets in different compartments of the small intestine of piglets. *Vet. Immuno. Immunopath.* **72**: 167-173

Pié, S., Lallès, J.P., Blazy, F., Laffitte, J., Sève, B. and Oswald I.P. (2004) Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J. Nutr. Immunol.* **134**:641-647

Raymond, C.R. and Wilkie, B.N. (2004) Th-1/Th-2 type cytokine profiles of pig T-cells cultured with antigen-treated monocyte-derived dendritic cells. *Vacc.* **22**:1016-23

Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D. (2002) Cellules, tissus et organes du système immunitaire, Chapitre 2. Dans *Immunologie*, 3 ed., pp.480. Éditions De Boeck

Rothenfusser, S., Tuma, E., Endres, S. and Hartmann, G. (2002) Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Hum. Immunol.* **63**:1111-9

Saif, L.J. (1996) Mucosal immunity: an overview and studies of enteric and respiratory coronavirus infections in a swine model of enteric disease. *Vet. Immuno. Immunopath.*

54:163-169

Salmon, H. (1999) The mammary gland and neonate mucosal immunity. *Vet. Immuno. Immunopath.* **72:143-155**

Sarmiento, J.I., Dean, E.A. and Moon, H.W. (1988) Effects of weaning on diarrhea caused by enterotoxigenic *Escherichia coli* in three-week-old pigs. *Am. J. Vet. Res.* **49: 2030-2033**

Singh, M. and O'Hagan, D.T. (2003) Recent advances in veterinary vaccine adjuvants. *Int. J. Parasitol.* **33:469-478**

Snoeck, V., Huyghebaert, N., Cox, E., Vermeire, A., Vancaeneghem, S., Remon, J.P. and Goddeeris, B.M. (2003) Enteric-coated pellets of F4 Fimbriae for oral vaccination of suckling piglets against enterotoxigenic *Escherichia coli* infections. *Vet. Immunol. Immunopath.* **96:219-227**

Snoeck, V., Verfaillie, T., Verdonck, F., Goddeeris, B.M., Cox, E. (2006) The jejunal Peyer's patches are the major inductive sites of the F4-specific immune response following intestinal immunisation of pigs with F4 (K88) fimbriae. *Vacc.* **24**:3812-20

Solano-Aguilar, G.I., Vengroski, K.G., Beshah, E., Douglass, L.W. and Lunney, J.K. (2001) Characterisation of lymphocyte subsets from mucosal tissues in neonatal swine. *Develop. Comp. Immuno.* **25**:245-263

Stokes, C.R., Bailey, M. and Wilson A.D. (1994) Immunology of the porcine gastrointestinal tract. *Vet. Immuno. Immunopath.* **43**:143-150

Stokes, C.R. and Bailey, M. (2000) The porcine gastrointestinal lamina propria: an appropriate target for mucosal immunization? *J. Biotech.* **83**:51-55

Straw, B.E., Zimmerman, J.J., D'Allaire, S., Taylor D.J. (2006) *Escherichia coli* infections, Section III Bacterial Diseases, Diseases of swine, 9th ed., pp. 1153. Blackwell

Tizard, I.R. (2004) Lymphocytes, Chapter 9 et 21. Veterinary immunology: an introduction, 7th ed., pp. 494. Elsevier

Taskalova-Hogenova, H., Mandel, L., Trebichavsky, I., Kovaru, F. Barot, R. and Sterzl, J. (1994) Development of immune responses in early pig ontogeny. *Vet. Immuno. Immunopath.* **43**:135-143

Torres, A.G., Zhou, X., and Kaper, J.B. (2005) Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect. Immun.* **1**:18-29

Tuboly, S., Bernath, S., Glavits, R. and Medveczky, I. (1988) Intestinal absorption of colostral lymphoid cells in newborn piglets. *Vet. Immuno. Immunopath.* **20**:75-85

Vajdy, M., Srivastava, I., Polo, J., Donnelly, J., O'Hagan, D., and Singh, M. (2004) Mucosal adjuvants and delivery systems for protein-, DNA- and RNA-based vaccines. *Immunol. Cell Biol.* **82**:617-627

Van den Broeck, W., Cox, E. and Goddeeris, B.M. (1999a). Induction of immune responses in pigs following oral administration of purified F4 fimbriae. *Vacc.* **17**:2020-2029

Van den Broeck, W., Cox, E. and Goddeeris, B.M. (1999b) Receptor-dependent immune responses in pigs after oral immunization with F4 fimbriae. *Infect. Immun.* **67**:520-526

Van den Broeck, W., Cox, E., Oudega, B. and Goddeeris, B.M. (2000) The F4 fimbrial antigen of *Escherichia coli* and its receptors. *Vet. Microbial.* **71**:223-244

Van den Broeck, W., Bouchaut, H., Cox, E. and Goddeeris, B.M. (2002) F4 receptor-independent priming of the systemic immune system of pigs by low oral doses of F4 fimbriae. *Vet. Immunol. Immunopath.* **85**:171-8

Van der Stede, Y., Verdonck, F., Verfaillie, T., Goddeeris, B.M. and Cox, E. (2005) Porcine specific CpG-oligodeoxynucleotide activates B-cells and increases the expression of MHC-II molecules on lymphocytes. *Vet. Immunol. Immunopath.* **105**:115-124

Van Ginkel, F.W., Nguyen, H.H. and McGhee J.R. (2000) Vaccines for mucosale immunity to combat emerging infectious diseases. *Emerg. Infect. Dis.* **6**:123-132

Verdonck, F., Cox, E., van Gog, K., Van der Stede, Y., Duchateau, L., Deprez, P. and Goddeeris, B.M. (2002) Different kinetic of antibody responses following infection of newly weaned pigs with an F4 enterotoxigenic *Escherichia coli* strain or an F18 verotoxigenic *Escherichia coli* strain. *Vacc.* **20**:2995-3004

Verdonck, F., Cox, E., and Goddeeris, B.M. (2004a) F4 fimbriae expressed by porcine enterotoxigenic *Escherichia coli*, an example of an eccentric fimbrial system ? *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 7:155-169

Verdonck, F., Cox, E., Van der Stede, Y. and Goddeeris, B.M. (2004b) Oral immunization of piglets with recombinant F4 fimbrial adhesin FaeG monomers induces a mucosal and systemic F4-specific immune response. *Vacc.* 22:4291-4299

Verdonck, F., Snoeck, V., Goddeeris, B.M. and Cox, E. (2005a) Cholera toxin improves the F4(K88)-specific immune response following oral immunization of pigs with recombinant FaeG. *Vet. Immunol. Immunopath.* 103:21-29

Verdonck, F., De Hauwere, V., Bouckaert, J., Goddeeris, B.M. and Cox, E. (2005b) Fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli* function as a mucosal carrier for a coupled heterologous antigen. *J. Contr. Rel.* 104:243-258

Verfaillie, T., Cox, E., To, L.T., Vanrompay, D., Bouchaut, H., Buys, N., et al. (2001) Comparative analysis of porcine cytokine production by mRNA and protein detection. *Vet. Immunol. Immunopath.* 81:97-112

Verfaillie, T. Cox, E. and Goddeeris, B.M. (2005) Immunostimulatory capacity of DNA vaccine vectors in porcine PMBC : a specific role for CpG-motifs? *Vet. Immunol. Immunopath.* **103**:141-151

Wannemuehler, M.J. and Galvin, J.E. (1994) Bacterial immunogens and protective immunity in swine. *Vet. Immunol. Immunopath.* **43**:117-126

Yi, A.K., Chace, J.H., Cowdery, J.S. and Krieg, A.M. (1996) IFN-gamma promotes IL-6 and IgM secretion in response to CpG motifs in bacterial DNA and oligodeoxynucleotides. *J. Immunol.* **156**:558-64

Yuki, Y. and Kiyono, H. (2003) New generation of mucosal adjuvants for the induction of protective immunity. *Rev. Med. Virol.* **13**:293-310

Zhang, L., Tian, X. and Zhou, F. (2006) *In vivo* effects of oligodeoxynucleotides containing synthetic immunostimulatory motifs in weaned piglets. *Int. Immunopharma.* **6**:1623-31.

Annexe 1

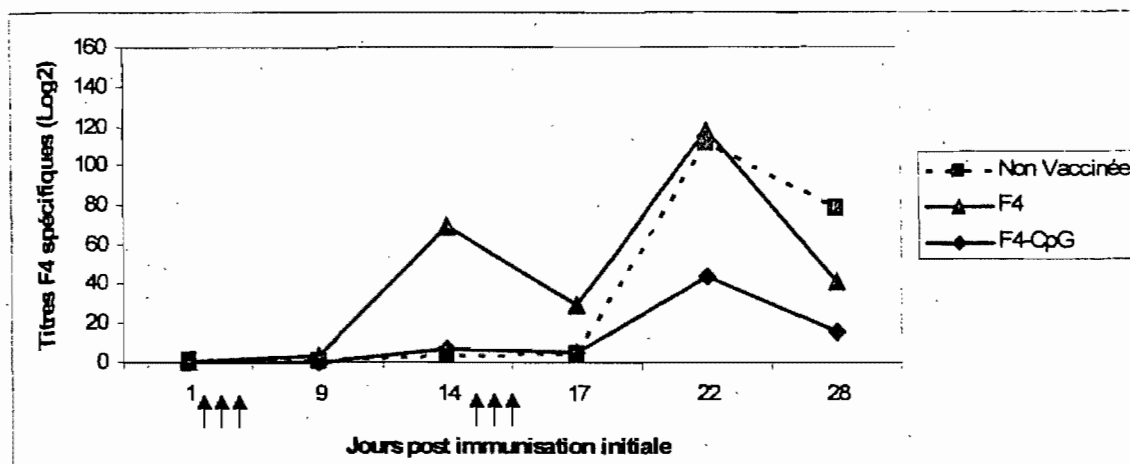


Fig. 7. Titres sériques moyens d'anticorps IgM anti-F4 des groupes F4, F4-CpG, et non vaccinés de la première expérience in vivo. Réponse immunitaire spécifique au fimbriae F4 chez le groupe non vacciné démontrant une contamination par des bactéries F4+. Les flèches indiquent les jours consécutifs de la procédure d'immunisation orale. Jours 1: immunisation initiale, Jours 28: Nécropsie.

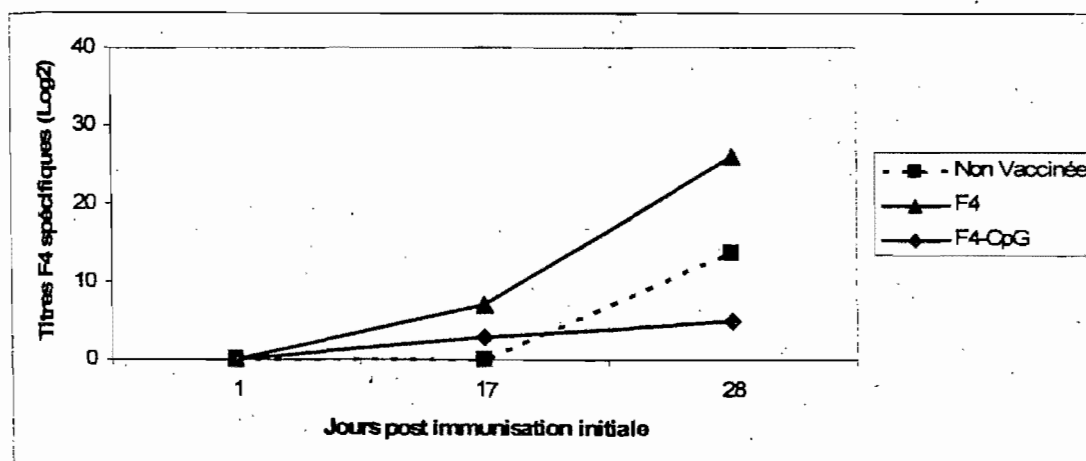


Fig. 8. Titres sériques moyens d'anticorps IgA anti-F4 des groupes F4, F4-CpG, et non vaccinés de la première expérience in vivo. Réponse immunitaire spécifique au fimbriae F4 chez le groupe non vacciné démontrant une contamination par des bactéries F4+.

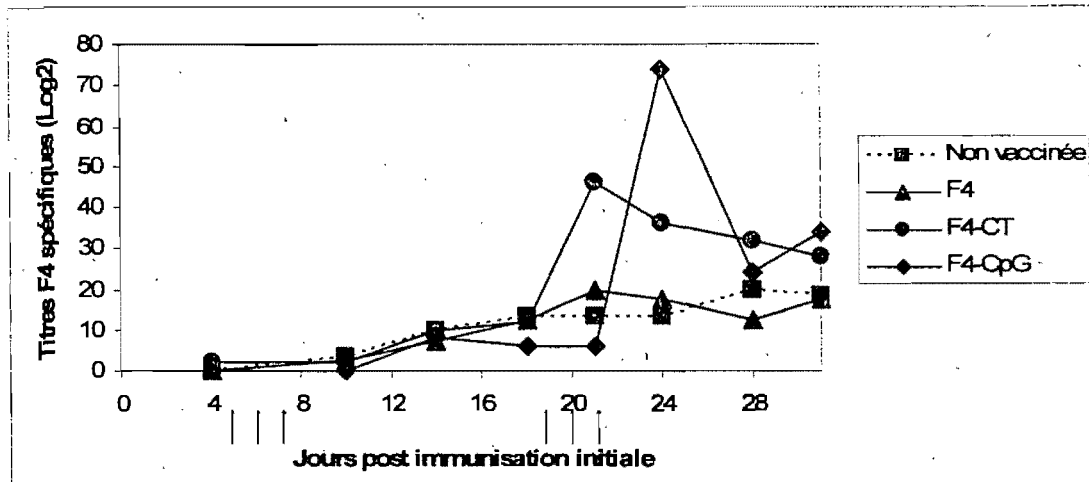


Fig. 9. Titres sériques moyens d'anticorps IgM anti-F4 des groupes F4, F4-CT, F4-CpG, et non vaccinés de la deuxième expérience in vivo. Réponse immunitaire spécifique au fimbriae F4 chez le groupe non vacciné démontrant une contamination par des bactéries F4+. Les flèches indiquent les jours consécutifs de la procédure d'immunisation orale. Jour 5: immunisation initiale, Jour 31: Nécropsie.

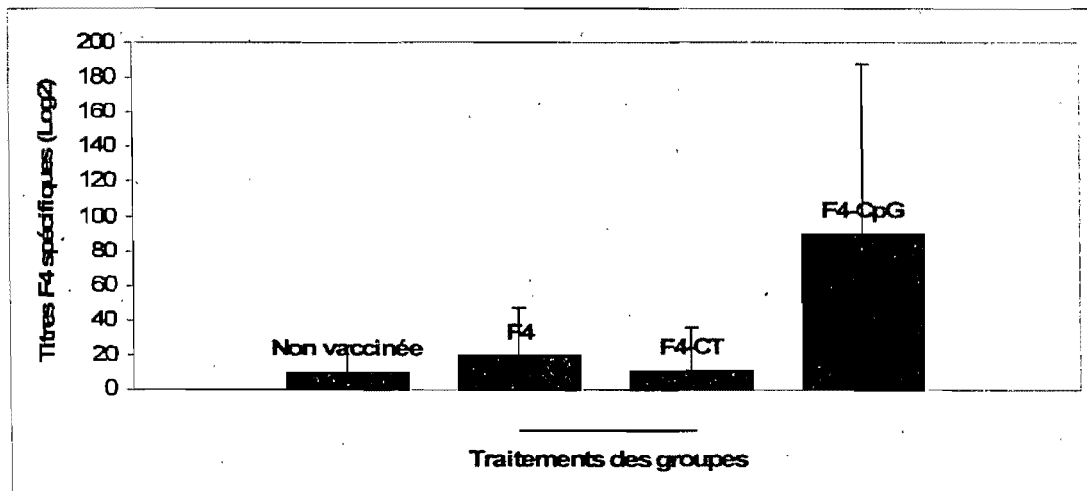


Fig. 10. Titres moyens d'anticorps IgM anti-F4 des contenus intestinaux des groupes F4, F4-CT, F4-CpG, et non vaccinés de la deuxième expérience in vivo.

Annexe 2

Tableau II. Résumé des différentes expériences réalisées pour vérifier l'intégrité des fimbriae F4 après l'irradiation

| Vaccin F4 lyophilisée - Avant irradiation | Résultats |
|--|--|
| Comptage bactérien (0,1g lyophilisat dans 1ml PBS) | 4*10 ^{E2} bactéries / 0,1 g lyophilisat |
| Dosage des protéines (0,01g lyophilisat dans 1ml PBS) | 587 ug F4 / 0,01 g de lyophilisat |
| Test d'adhésion par immunofluorescence anti-F4 (0,01g lyophilisat dans 1 ml PBS) | Adhésion des F4 et très peu de non-spécificité |
| Western blot Anti-K88 lapin | détection sur membrane |
| SDS-PAGE (0,01g lyophilisat dans 1ml PBS) pureté du F4 | Bande très faible au niveau des flagelles à 35 kDa et fimbriae F4 situé a 27,5 kDa |
| Vaccin F4 lyophilisée - Après irradiation | Résultats |
| Comptage bactérien (0,1g lyophilisat dans 1ml PBS) | 0 bactéries / 0,1 g lyophilisat |
| Dosage des protéines (0,01g lyophilisat dans 1ml PBS) | 674 ug F4 / 0,01 g de lyophilisat |
| Test d'adhésion par immunofluorescence anti-F4 (0,01g lyophilisat dans 1 ml PBS) | Adhésion des F4 et très peu de non-spécificité |
| Western blot Anti-K88 (F4) lapin | détection sur membrane |
| SDS-PAGE (0,01g lyophilisat dans 1ml PBS) | Pas de bande au niveau des flagelles à 35 kDa et fimbriae F4 situé a 27,5 kDa |

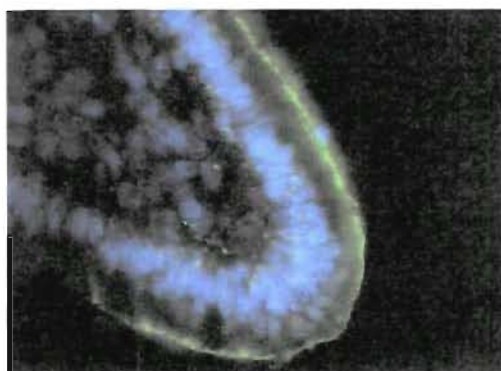


Fig. 11. Test d'adhésion par immunofluorescence anti-F4 – Avant irradiation



Fig. 12. Test d'adhésion par immunofluorescence anti-F4 – Après irradiation

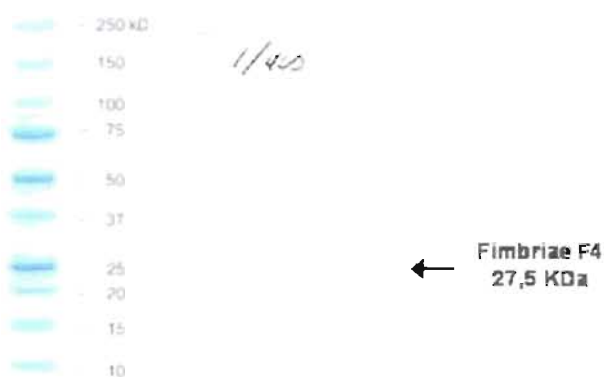


Fig. 13. Détection du fimbriae F4 par western sur préparation de F4 après irradiation

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

IDENTIFICATION DE L'ETUDIANT

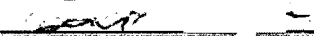



| | | |
|--|--|-------------------------------------|
| Nom de l'étudiant Benjamin Delisle | | Code permanent [REDACTED] |
| Sigle du programme M.Sc. | Titre du programme Sciences vétérinaires | Option Microbiologie |

DESCRIPTION DES ARTICLES

| | |
|---|----------------------------|
| Auteurs | |
| Delisle, Benjamin; Calinescu, Carmen; Mateescu, Mircea-Alexandru; Fairbrother, John M, Nadeau, Éric | |
| Titre | |
| Oral immunisation with F4 fimbriae and CpG enhances F4-specific mucosal response and induces Th1 and Th2 cytokine modulation in swine | |
| Revue | Date de publication |
| Vaccine | |

| | |
|---------|---------------------|
| Auteurs | |
| | |
| Titre | |
| | |
| Revue | Date de publication |
| | |

DECLARATION DES COAUTEURS

| Déclaration | | |
|--|--|--------------------|
| <p>À titre de coauteurs de l'article identifiés ci-dessus, nous autorisons le microfilmage du mémoire et nous sommes d'accord que Benjamin Delisle inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).</p> <p>ORA/ IMMUNISATION WITH F4 FIMBRIAE AND CPG ENHANCES F4-SPECIFIC MUCOSAL RESPONSE AND INDUCES TH1 AND TH2 CYTOKINE MODULATION IN SWINE</p> | | |
| Coauteur | Signature | Date |
| Calinescu, Carmen |  | le 11 juin 2008 |
| Coauteur | Signature | Date |
| Mateescu, Mircea-Alexandru |  | Le 12 juin 2008 |
| Coauteur | Signature | Date |
| Fairbrother, John M |  | 2008-07-02 |
| Coauteur | Signature | Date |
| Nadeau, Eric |  | le 02 juillet 2008 |
| Coauteur | Signature | Date |
| | | |
| Coauteur | Signature | Date |
| | | |
| Coauteur | Signature | Date |
| | | |
| Coauteur | Signature | Date |
| | | |